UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY
SEP 24 '51

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
A.v.MURALT · L.RUZICKA · J.WEIGLE
Bern Zürich Genève
Redactor: H.MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG. · BASEL 10
SUISSE - SCHWEIZ - SVIZZERA - SWITZERLAND

Vol. VII. – Fasc. 8 15. VIII. 1951 Fr. 3.–

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

J. Asselineau et E. Lederer: Recherches récentes sur la chimie des lipides du bacille tuberculeux 281

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

J. A. Barltrop and J. A. D. Jeffreys: *o*-Quinones as Dienophiles 290
A. Eschenmoser und A. Fürst: Zur Konstitution der Caryophyllensäure 290
C. Beaudet: Substances nouvelles apparantées à l'adrénochrome 291
C. Beaudet, F. Debot, H. Lambot et J. Toussaint: La monosemicarbazone de l'adrénochrome 293
H. Deuel, L. Anyas-Weisz und J. Solms: Über den Kontaktaustausch an Ionenaustauschern 294
Ch. Wunderly: Über die Farbstoffbindung durch monomolekulare Proteinschichten 296
Z. G. Szabó, S. Orsós, and L. Csányi: Model Experiments for the Production of Gastric Hydrochloric Acid. . . 297
R. W. G. Wyckoff: Possible Immature Forms of Bacteriophage 298
Taina Kuusi: Über die chemische Natur der Induktionsstoffe im Implantatversuch bei *Triton* 299
L. Raunich: Über die Anlage des Telencephalons in der Neurula der Amphibien und die Faktoren seiner bilateralen Ausbildung 300
H. Gebhardt: Lokalisatorischer Nachweis von Thermorezeptoren bei *Dorcus parallelepipedus* L. und *Pyrrhocoris apterus* L. 302
M. Maqsood: Observations on Staining Affinity and Morphology of Mammalian Spermatozoa 303
M. Maqsood: An Abnormality of Mammalian Spermatozoa 304
D. Campbell and B. H. Persson: Use of Track Autoradiography in Studies on the Sulfur Metabolism of Connective Tissue 304
R. Pulver und R. Domenjoz: Zur Spezifität sogenannter Esterasegifte 306
B. C. De Landsheere: Effect of Indirubin on White Blood Cell Count of the Guinea Pig 307
R. Meier und Bertha Schär: Wirkung von Harnextraktstoffen auf die Bewegungsreaktionen der Leukozyten . . 308
D. Merlini: Production of Severe Anemia without Diabetes by Combined Action of Ascorbic Acid and Alloxan . 309
P. N. Witt: *d*-Lysergsäure-diæthylamid (LSD 25) im Spinnentest 310
K-E. Hagbarth: Subdivision of Cutaneous Afferents According to Skin Areas and Reflex Effects 311
J. Govaerts: Méthode de dosage du ^{45}Ca et du ^{32}P au cours de l'emploi simultané des deux radioisotopes (Pro Laboratorio) 312
S. Markees: Die Ausschaltung des Azetessigsäurefehlers bei der Brenztraubensäurebestimmung (Pro Laboratorio) 314

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Studiorum progressus: W. S. Johnson: The Relative Stability of Stereoisomeric Forms of Fused Ring Systems . 315
Studiorum progressus: G. Hevesy, R. Ruyssen, and M. L. Beeckmans: Effect of Urethane on the Incorporation of C^{14} into Animal Tissue 317

EXPERIENTIA

L'Experientia publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die Experientia stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

Experientia si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of Experientia is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPER.

L'Experientia paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Prix du numéro fr. 3.–. Abonnement pour un an fr. 28.— pour la Suisse; pour l'étranger fr. 34.—. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'Experientia exclusivement à l'éditeur soussigné.

Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 35 jours avant la darution, c'est-à-dire le 10 du mois pour le numéro du mois suivant

Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à par. de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.

Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 200.—, $^1/_2$ page fr. 120.—, $^1/_4$ page fr. 70.—. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.

L'Experientia est imprimée en Suisse.

Editions Birkhæuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 49800; adresse télégraphique: Edita Bâle

Die Experientia erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Portugal, Schweden und Tschechoslowakei nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen.

Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 28.—, im Ausland sFr. 34.—; die Einzelnummer kostet Fr. 3.–.

Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschließlich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluß 35 Tage vor Erscheinungstermin, d.h. am 10. des Monats für den folgenden Monat.

Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 200.—, $^1/_2$ Seite Fr. 120 — $^1/_4$ Seite Fr. 70.—; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.

Die Experientia wird in der Schweiz gedruckt.

Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstraße 15
Tel. 49800; Telegrammadresse: Edita Basel

Experientia esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. Il prezzo del singolo fascicolo è di fr. 3.–. L'abbonamento annuo è di fr. 28.— per la Svizzera; all'estero fr. 34.—. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

Tutti gli invii alla redazione di Experientia vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.

La redazione di ogni fascicolo si chiude 35 giorni prima del termine di pubblicazione, cioè al 10 del mese, per il mese seguente.

Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.

Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 200.—, $^1/_2$ pag. fr. 120.—, $^1/_4$ pag. fr. 70.—; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.

Experientia si stampa in Isvizzera.

Casa editrice Birkhæuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 49800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

Experientia is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price per number is fr. 3.–, by annual subscription by inland-mail fr. 28.—; other countries fr. 34.—. Prices in Swiss currency.

All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers on the 10th of the preceding month.

The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 200.—, $^1/_2$ page fr. 120.—, $^1/_4$ page fr. 70.—. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 49800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / E. Birkhäuser & Cie., Basel

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia VII/8

CIBA AG., Basel
E. Mettler, Zürich
S. Hirzel Verlag, Zürich
Ganz & Co., Zürich
Birkhäuser AG., Basel
Steiner & Co., Basel
Sandoz AG., Basel
Biological Abstracts, Philadelphia

Dr. H. RUTISHAUSER, Dr. A. SPEISER
und Prof. Dr. E. STIEFEL, ETH. Zürich

Programmgesteuerte digitale Rechengeräte

Elektronische Rechenmaschinen

Mitteilungen aus dem Institut für angewandte Mathematik an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

Nr. 2 Herausgegeben von
PROF. DR. E. STIEFEL

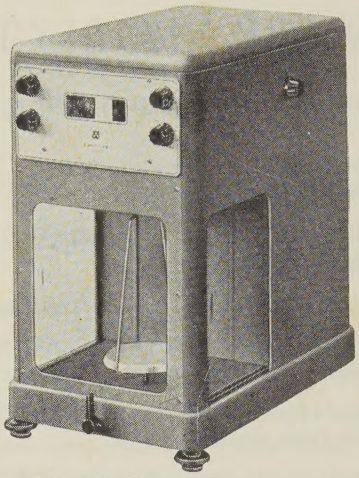
1951 102 Seiten 28 Figuren Broschiert Fr. 8.50

Seit dem Bau der ersten programmgesteuerten Rechenmaschinen in den Vereinigten Staaten haben sich die mathematischen und technischen Grundlagen für die Bedienung und Konstruktion dieser Geräte stark entwickelt. Eine zusammenfassende Darstellung des ganzen Gebietes war daher erwünscht. Der vorliegende Bericht verfolgt den Zweck, einem weiteren Leserkreis des deutschen Sprachgebietes eine kurzgefaßte Übersicht und erste Hilfe für das Studium der Spezialliteratur zu geben.

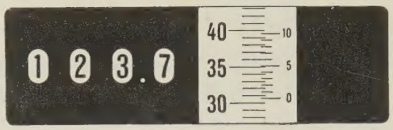
Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

VERLAG BIRKHÄUSER BASEL

METTLER Analysenwaagen



Sie lesen direkt ab:



genau
schnell
einfach
sicher

Gewicht:
123,7306 g

Verlangen Sie unverbindlich Offerte oder Demonstration

E. METTLER Fabrik für Analysenwaagen
ZÜRICH 1
Pelikanstr. 19, Tel. (051) 25 25 70

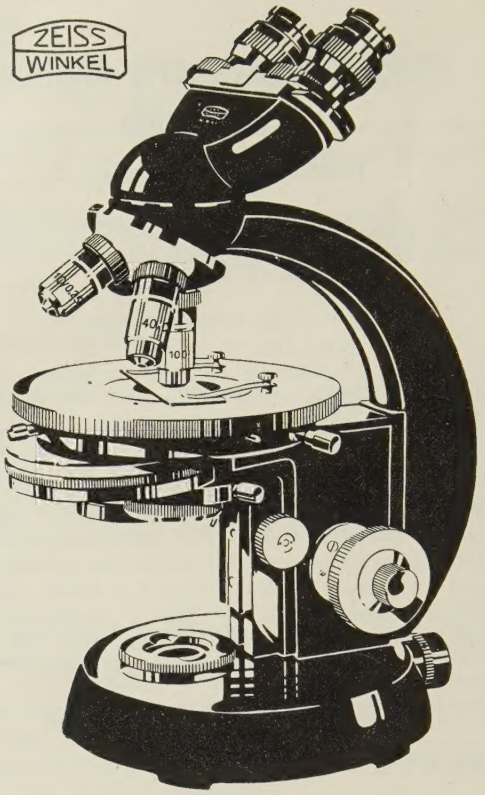
NEUES **ZEISS**-WINKEL
STANDARD-MIKROSKOP GF 524

Das Ergebnis einer hundertjährigen Tradition !

- **Lichtstarke Einbaubeleuchtung (Köhler'sches Prinzip)**
- **Tiefliegende, koaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung**
- **Neuartiger Gleittisch (Fettfriktion)**
- **Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive**
- **Vergrösserungswechsler für die Okulare (ohne Okularwechsel)**
- **Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor**
- **Hervorragende Optik**

Auskunft und Vorführung durch die Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ & Co
Bahnhofstrasse 40
Tel. (051) 23 97 73
Zürich



Soeben erschienen

P. FINSLER
ordentlicher Professor an der Universität Zürich

Über Kurven und Flächen in allgemeinen Räumen

Unveränderter Nachdruck der Dissertation von 1918
Mit ausführlichem Literaturverzeichnis von H. SCHUBERT

XII + 158 Seiten In Ganzleinenband Fr. 14.80, broschiert Fr. 12.–

Inhalt der Dissertation:

I. *Grundbegriffe:* Geometrische Gebilde – Das Projizieren – Die Längenmessung – Die Winkelmessung – Das Berührungsmaß. II. *Kurventheorie:* Die Schmiegungsräume und die Kurvennormalen – Die erste Krümmung – Die höheren Krümmungen – Andere Definition der höheren Krümmungen – Die natürliche Gleichung einer Kurve. III. *Flächentheorie:* Allgemeines – Geodätische Linien, Satz von MEUSNIER, Asymptotenlinien – Die höheren Krümmungen einer Fläche – Die Dupinsche Indikatrix – Die Krümmung von zweidimensionalen Flächen – Krümmung und Torsion der geodätischen Linien, Krümmungslinien – Krümmung und Torsion der Asymptotenlinie, abwickelbare Flächen.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

VERLAG BIRKHÄUSER BASEL

EXPERIENTIA

Vol. VII - Fasc. 8 Pag. 281–320 15. VIII. 1951

Recherches récentes sur la chimie des lipides du bacille tuberculeux[1]

Par JEAN ASSELINEAU et EDGAR LEDERER, Paris[2]

Le bacille tuberculeux présente une teneur en lipides remarquablement élevée, puisqu'elle peut atteindre 30 à 40% de son poids sec. La constitution si particulière de ces lipides a fait l'objet de nombreux travaux, parmi lesquels ceux d'ANDERSON et de ses collaborateurs occupent une place fondamentale. D'excellentes revues d'ensemble sur la chimie des lipides du bacille tuberculeux ont déjà été publiées par ANDERSON[3] entre 1939 et 1943, et des revues plus générales par ROULET et BRENNER[4] en 1941 et par SEIBERT[5] en 1950.

ANDERSON a décrit en 1927 une méthode très utile de séparation de ces lipides en plusieurs groupes bien distincts[6]: graisses solubles dans l'acétone, fraction phosphatidique (insoluble dans l'acétone), cires solubles dans le chloroforme et lipides liés.

1° *Graisses solubles dans l'acétone.* Dans cette fraction, il y a de 20 à 50% d'acides gras libres; le reste est constitué non de glycérides, mais d'esters d'acides gras avec le disaccharide *tréhalose*[7]. Nous parlerons plus tard des acides gras. Rappelons la présence dans ces graisses de petites quantités d'acides aromatiques (acides phényl-acétique, salicylique et anisique)[8].

Les graisses de souches humaines et du BCG contiennent un pigment naphtoquinonique que FRANCIS et ses collaborateurs[9] ont isolé sous forme d'une huile jaune ressemblant à la vitamine K_2. Il est probable que le *phthiocol*, point de fusion 174°C (méthyl-1,hydroxy-2-naphtoquinone,1,4), isolé par NEWMAN et ANDERSON[10] est un artefact formé par action de l'alcali sur le «précurseur» de FRANCIS et ses collaborateurs[9]. FIESER et ses collaborateurs[11] ont déjà émis cette hypothèse en 1939 et PARSCHIN[1] a trouvé qu'il n'y a pas de phthiocol libre dans le bacille tuberculeux. Nous pouvons confirmer l'absence de phthiocol libre dans les graisses de souches humaines et du BCG.

2° *Fraction phosphatidique.* L'acétone à l'ébullition sépare cette fraction en une partie insoluble – les phosphatides vrais – et une partie soluble, dépourvue de phosphore, que nous appelons les *cires A*.

a) Phosphatides. Il est bien connu que la composition des bacilles varie avec celle du milieu de culture. Cette variation peut être très importante puisque des bacilles de souche humaine *H-37*, cultivés sur milieu de LONG où le glycérol a été remplacé par du dextrose, ne renferment pas de phosphatide[2].

Les phosphatides ne constituent généralement que 0,5 à 1,5% du bacille et renferment de l'azote (environ 0,4%), principalement sous forme ammoniacale; aucune base azotée telle que choline ou colamine n'a pu être mise en évidence. D'ailleurs, certains auteurs (K. BLOCH[3], BOISSEVAIN et RYDER[4], MACHEBŒUF[5], PANGBORN[6]) obtiennent après purification poussée de leurs échantillons, des préparations ne renfermant plus d'azote, ou seulement des traces. Dans la constitution des phosphatides entrent environ 60% d'acides gras, formant un mélange très complexe d'acides saturés, insaturés et ramifiés, où sont présents notamment les acides tuberculostéarique et phthioïque. Ces acides gras sont liés à des polyosides phosphorylés, renfermant du glycérol, du mannose et de l'inositol. Mais la composition de ces polyosides semble varier suivant les souches, de sorte qu'ANDERSON et ses collaborateurs[7] en concluent que «chaque lot de bacilles cultivé sur milieu artificiel, élabore des composés organo-phosphoriques différents». Récemment, ANDERSON et SÜTÖ-NAGY[8] ont isolé à partir de phosphatides de bacilles résiduaires de fabrication de tuberculine, des *acides*

[1] D'après une conférence faite par E. LEDERER devant la Société Chimique de Zurich, le 22 novembre 1950, et la Société Chimique de Bâle, le 23 novembre 1950.

[2] Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris 5e.

[3] R. J. ANDERSON, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe *3*, 145 (1939); Harvey Lectures 271 (1939–1940); Chem.Rev.*29*,225 (1941); Yale J. Biol. Med. *15*, 311 (1943).

[4] F. ROULET et M. BRENNER, Zentralbl. gesam. Tuberk. Forsch. *56*, 193 (1941).

[5] F. B. SEIBERT, Ann. Rev. Microbiol. *4*, 35 (1950).

[6] Le schéma de cette méthode a été exposé récemment par S. RAFFEL dans Exper. *6*, 410 (1950).

[7] R. J. ANDERSON et M. S. NEWMAN, J. Biol. Chem. *101*, 499 (1933).

[8] Voir J. ASSELINEAU, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).

[9] J. FRANCIS, J. MADINAVEITIA, H. M. MACTURK et G. A. SNOW, Nature *163*, 365 (1949).

[10] R. J. ANDERSON et M. S. NEWMAN, J. Biol. Chem. *101*, 773 (1933); *103*, 197 (1933).

[11] L. F. FIESER, W. P. CAMPBELL et E. M. FRY, J. Amer. Chem. Soc. *61*, 2206 (1939).

[1] A. N. PARSCHIN, Biokhimiya *11*, 53 (1946).

[2] M. M. CREIGHTON, L. H. CHANG et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. *154*, 569 (1944).

[3] K. BLOCH, Z. physiol. Chem. *224*, 1 (1936); Biochem. Z. *285*, 372 (1936).

[4] C. H. BOISSEVAIN et C. T. RYDER, Amer. Rev. Tuberc. *24*, 751 (1931).

[5] M. A. MACHEBŒUF et M. FAURE, C. r. Acad. Sci. *209*,700 (1939).

[6] M. C. PANGBORN, Discussions Faraday Soc. *6*, 110 (1949).

[7] G. I. DE SÜTÖ-NAGY et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. *171*, 749 (1947).

[8] G. I. DE SÜTÖ-NAGY et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. *171*, 761 (1947).

inosito-monophosphorique et *inosito-glycéro-diphosphorique.*

Notons, en passant, la richesse du bacille tuberculeux en *inositol*, qui peut atteindre jusqu'à 9% du poids sec[1]. Il n'est pas exclu que l'action tuberculostatique de la *streptomycine* soit due à un antagonisme envers l'inositol du bacille; Rhymer et ses collaborateurs[2] ont montré, en effet, que le lipositol, phosphatide naturel végétal et animal, contenant de l'inositol, inhibe l'action bactériostatique de la streptomycine.

b) Les *cires A* sont essentiellement un mélange d'esters de *phthiocérol*, dialcool ramifié et méthoxylé, $C_{35}H_{72}O_3$, point de fusion 73° C (Stodola et Anderson[3]). Par étude de films monomoléculaires, Ställberg et Stenhagen[4] ont trouvé que le phthiocérol est constitué par une longue chaîne avec un ou plusieurs groupes polaires près d'une extrémité. Puis, travaillant sur le *phthiocérane*, préparé par Ginger et Anderson[5] (hydrocarbure correspondant au phthiocérol), Ställberg, Stenhagen, Sheppard, Sutherland et Walsh[6] ont trouvé que la chaîne fondamentale de cet hydrocarbure est identique au *méthyl-4-tritriacontane*. Ställberg-Stenhagen et Stenhagen[7] ont cherché à obtenir des renseignements complémentaires sur la configuration stérique du phthiocérane par synthèse. Jusqu'ici, le phthiocérol a été isolé de souches humaines (*H-37*, *A-10*, *A-12*, *A-13* et *A-14*) et de la souche bovine *Vallée* par Anderson[8] et de la souche humaine *Test* et du BCG par Asselineau[9].

A partir de bacilles aviaires, de *M.phlei* et d'un «bacille de la lèpre», Anderson[8] a isolé, au lieu de phthiocérol, un mélange de *d-eicosanol-2* et de *d-octadécanol-2*.

Notons encore la présence d'acide mycolique libre dans les cires A de la souche humaine *Test*.

Acides gras des graisses et phosphatides. Les acides gras de ces fractions constituent un mélange très complexe; deux d'entre eux ont attiré l'attention d'un grand nombre de chercheurs: *l'acide tuberculostéarique* et *l'acide phthioïque*, qui ont été isolés pour la première fois par Anderson.

D'une étude cristallographique aux rayons X de l'*acide tuberculostéarique*, Velick[10] a conclu que l'acide naturel doit être un isomère optique de l'acide méthyl-10-stéarique (une telle structure ayant été attribuée à cet acide par Spielman[1]). Ställberg-Stenhagen[2] a synthétisé les deux isomères optiques. Par comparaison de l'acide naturel et de ses dérivés avec les acides actifs qu'ils ont synthétisés, Prout, Cason et Ingersoll[3] ont établi que cet acide est constitué par l'isomère lévogyre de l'acide méthyl-10-stéarique, son pouvoir rotatoire ayant échappé au cours des premières recherches en raison de sa très faible valeur. Une nouvelle synthèse de l'acide (±)-tuberculostéarique par la méthode de Kolbe vient d'être décrite par Linstead, Lunt et Weedon[4].

En se basant sur des considérations théoriques relatives au pouvoir rotatoire, Cason et Prout[5] ont montré que l'*acide phthioïque* ne peut être l'acide triméthyl-3-13-19-tricosanoïque, comme Polgar et Robinson[6] l'avaient pensé, ainsi que Wilson[7]. Grâce à une méthode de fractionnement des acides par cristallisation des semicarbazones de leurs acétol-esters[8], Chanley et Polgar[9] ont pu isoler des acides phthioïques en C_{26}, C_{28} et C_{30} et montrer qu'il s'agit en réalité d'*acides α,β-éthyléniques*, ramifiés, possédant notamment un *méthyl en α*. Presque simultanément, Cason et Sumrell[10], travaillant sur 24 g de phthioate de méthyle provenant d'Anderson, ont isolé un acide $C_{28}H_{54}O_2$, α,β-éthylénique, possédant probablement quatre ramifications, dont une en α et peut-être une autre en γ.

A partir des cires extraites par le chloroforme, de bacilles résiduaires de fabrication de tuberculine, Ginger et Anderson[11] ont isolé un acide lévogyre en $C_{30}H_{60}O_2$, qu'ils ont appelé *acide mycocérosique*; on ne sait encore rien sur sa constitution chimique.

3° *Cires extraites par le chloroforme.* Ces cires représentent jusqu'à 12% du poids sec des bacilles. Anderson a montré qu'elles sont constituées par des mélanges d'esters entre le glycérol, du phthiocérol et des polysaccharides (à base de galactose, mannose et arabinose) d'une part, et des acides gras d'autre part; le plus important de ces derniers est un acide hydroxylé à très haut poids moléculaire, appelé *acide mycolique*. Nous préciserons d'abord la structure de cet acide et passerons ensuite à l'étude des complexes lipopolysaccharidiques dans lesquels l'acide mycolique se trouve engagé.

[1] G. Brownlee. Ann. Rep. progr. Chem. *45*, 292 (1948).
[2] I. Rhymer, G. I. Wallace, L. W. Byers et H. E. Carter, J. Biol. Chem *169*, 457 (1947).
[3] F. H. Stodola et R. J. Anderson, J. Biol. Chem. *114*, 467 (1936).
[4] S. Ställberg et E. Stenhagen, J. Biol. Chem. *143*, 171 (1942).
[5] L. G. Ginger et R. J. Anderson, J. Biol. Chem. *157*, 213 (1945).
[6] S. Ställberg, E. Stenhagen, N. Sheppard, G. B. Sutherland et A. Walsh, Nature *160*, 580 (1947).
[7] S. Ställberg-Stenhagen et E. Stenhagen, J. Biol. Chem. *173*, 383 (1948).
[8] R. J. Anderson, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe *3*, 145 (1939); Harvey Lectures 271 (1939–1940); Chem.Rev.*29*,225 (1941); Yale J. Biol. Med. *15*, 311 (1943).
[9] J. Asselineau, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).
[10] S. F. Velick, J. Biol. Chem. *154*, 497 (1944).

[1] M. A. Spielman, J. Biol. Chem. *106*, 87 (1934).
[2] S. Ställberg-Stenhagen, Ark. Kemi Min. Geol. [A] *26*, N° 12 (1948).
[3] F. S. Prout, J. Cason et A. W. Ingersoll, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 1233 (1947); *70*, 298 (1948).
[4] R. P. Linstead, J. C. Lunt et B. C. L. Weedon, J. Chem. Soc. *1950*, 3331.
[5] J. Cason et F. S. Prout, J. Amer. Chem. Soc. *70*, 879 (1948).
[6] N. Polgar et R. Robinson, J. Chem. Soc. *1945*, 389.
[7] C. V. Wilson, J. Amer. Chem. Soc. *67*, 2161 (1945).
[8] N. Polgar, Biochem. J. *42*, 206 (1948).
[9] J. D. Chanley et N. Polgar, Nature *166*, 693 (1950).
[10] J. Cason et G. Sumrell, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 4837 (1950).
[11] L. G. Ginger et R. J. Anderson, J. Biol. Chem. *157*, 203 (1945).

Tableau I

Acides mycoliques isolés par Anderson

	humaine	Souche bovine			aviaire			Phlei	Lèpre
		tête	cœur	queue	α	β	γ		
Point de fusion	54–56°	71–75	56–58	52–54°	69–70	60–61°	65°	57–60°	65°
Poids moléculaire titrage .	1284	1203	1219	1180	510	1290	700	965	660 à 1350
Rast . .	1117							1000	
$[\alpha]_D(CHCl_3)$	+1,8°	+1,5°	+2,7°	+1,7°	+5,6°	+5,5°	+5,3°	+6,1°	+4,0°
Formule proposée	$C_{88}H_{176}O_4$		$C_{88}H_{176}O_4$		$(C_{38}H_{74}O_3)_2$	$C_{88}H_{174}O_3$		$C_{70}H_{138}O_6$	$(C_{44}H_{88}O_3)_2$
Indice d'iode	0				6,5	5,5	7	15,2	6
Acides gras libérés par pyrolyse	C_{26}		C_{26}		C_{24}* + C_{26}	C_{24}		C_{24}	

* Anderson avait proposé pour cet acide une structure ramifiée en C_{25}; Ställberg-Stenhagen et Stenhagen (J. Biol. Chem. *165*, 599 [1946]) ont montré qu'il s'agit en réalité d'un mélange d'acides normaux en C_{24} et C_{26}.

A.–*Acide mycolique.* Anderson et ses collaborateurs[1] ont montré (dans le cas de l'acide isolé de la souche humaine *H-37*) qu'il s'agit d'un acide hydroxylé et méthoxylé, répondant à la formule approximative $C_{88}H_{176}O_4$. Par chauffage sous vide, cet acide se pyrolyse avec libération d'acide *n*-hexacosanoïque, tandis que par oxydation chromique, il est coupé en un mélange complexe d'acides gras, parmi lesquels trois ont pu être identifiés: l'acide stéarique, l'acide *n*-hexacosanoïque et l'acide hexadécane-1,16-dicarboxylique. Des acides analogues ont été isolés par Anderson et ses collaborateurs de bacilles de souches bovine et aviaire, et de *M. phlei* et d'un bacille de la lèpre[2] (tabl. I). Leur poids moléculaire est compris entre 1000 et 1300, ils possèdent un hydroxyle, se coupent par pyrolyse avec libération d'un acide en C_{24} ou C_{26}, et sont *acido-résistants*.

Cherchant à purifier l'acide mycolique isolé de la souche humaine *Test*, Asselineau et Lederer[1] ont séparé par chromatographie sur alumine deux acides: acides α- et β-mycoliques, le dernier ne constituant qu'environ 10% du mélange initial (voir tabl. II). Les analyses élémentaires de ces deux acides et de leurs dérivés donnent des résultats pratiquement identiques et semblent confirmer la formule $C_{88}H_{176}O_4$ d'Anderson (tabl. III). Par déshydratation, les deux acides

Tableau II

Propriétés des acides α- et β-mycoliques et de leurs dérivés[3]

	α	β
Point de fusion . . .	55–56°	71–73°
Sel de potassium . . .	Soluble dans l'éther	Presque insoluble dans l'éther
$[\alpha]_D$ ($CHCl_3$)	+1,8°±0,5	+2,3°±0,5
Poids moléculaire (titrage)	1280, 1290 ±50	1290, 1300 ±50
	Point de fusion:	Point de fusion:
Ester méthylique . .	43–46°	52–55°
Acétate de l'acide . .	40–42°	44–48°
Acétate de l'ester . .	33–35°	42–44°
Alcool mycolique. . .	50–52°	60–63°
Acide anhydro-mycolique	36–38°	36–38°
Anhydro-mycolate de méthyle.	34–36°	34–36°

Tableau III

Composition élémentaire des acides α- et β-mycoliques et de leurs dérivés (souches humaines, *Test* et Aeschbacher)

		α		β	
		C	H	C	H
Acide mycolique	$C_{88}H_{176}O_4$	+0,07 +0,13	−0,38 −0,24	−0,13 +0,30	−0,14
		OCH_3—0,03		*OCH_3—0,23*	
Ester méthylique	$C_{89}H_{178}O_4$	−0,04	−0,41	+0,28	−0,30
Acétate d'acide	$C_{90}H_{178}O_5$	+0,25	−0,06	+0,18	−0,26
Acétate d'ester méthylique	$C_{91}H_{180}O_5$	+0,33	−0,36		
Alcool mycolique	$C_{88}H_{178}O_3$	+0,12	−0,31		
Acide anhydro-mycolique (IV)	$C_{88}H_{174}O_3$	+0,13 *OCH_3 +0,14*	−0,23	+0,34	−0,10
Alcool anhydro-mycolique	$C_{88}H_{176}O_9$	+0,06	−0,05		
Mycolane	$C_{87}H_{176}$	+0,18	−0,25		
Méthoxy-nor-mycolanone (II)	$C_{87}H_{174}O_2$	+0,21	±0,00		
Methoxy-oxo-mycolanoate de méthyle (III)	$C_{89}H_{176}O_4$	−0,21	−0,01		

Les chiffres de ce tableau indiquent les écarts en % des résultats d'analyse par rapport aux chiffres théoriques (d'après J. Asselineau et E. Lederer, Biochim. Biophys. acta *7*, 126 [1951] (voir formules p. 285).

[1] F. H. Stodola, A. Lesuk et R. J. Anderson, J. Biol. Chem. *126*, 505 (1938). – A. Lesuk et R. J. Anderson, J. Biol. Chem. *136*, 603 (1940).

[2] Le bacille de Hansen n'ayant jamais pu être cultivé *in vitro*, il s'agit plutôt d'un bacille paratuberculeux. – J. Cason et R. J. Anderson, J. Biol. Chem. *126*, 527 (1938). – R. J. Anderson et M. M. Creighton, J. Biol. Chem. *129*, 57 (1939). – R. L. Peck et R. J. Anderson, J. Biol. Chem. *140*, 89 (1941). – R. J. Anderson, J. A. Crowder, M. S. Newman et F. H. Stodola, J. Biol. Chem. *113*, 637 (1936).

[3] J. Asselineau et E. Lederer, C. r. Acad. Sci. *228*, 1892 (1949).

[1] J. Asselineau et E. Lederer, C. r. Acad. Sci. *228*, 1892 (1949).

Tableau IV

Acides mycoliques de souches humaines

	H 37-Anderson	Souche *H 37*-Rv		*H 37*-Ra		R_1		*L-25*	
Virulence	++	+++		−		+		?	
Acide mycolique		α	β	α	β	α	β	α	β
Point de fusion	56°	53°	69°	58°	73°	58°	73°	53°	55°
Poids moléculaire (titrage)	1284	1270		1290	1290	1350	1290	1320	1310
% OCH_3 (théor. 2,36)	1,4	1,37	2,08	0	1,68	0	−	1,21	0
Formule* probable	$C_{88}H_{176}O_4$	$C_{88}H_{176}O_4$ + $C_{87}H_{174}O_4$	$C_{88}H_{176}O_4$	$C_{87}H_{174}O_4$	$C_{87}H_{174}O_4$ + $C_{88}H_{176}O_4$	$C_{87}H_{174}O_3$		$C_{88}H_{176}O_4$ + $C_{87}H_{174}O_4$	$C_{87}H_{174}O_3$
Fonctions	− OH − OCH_3	−OH–OH + OCH_3 OH	− OH − OCH_3	− OH − OH	−OH–OH + OH OCH_3	− OH		—OH OCH_3 —OH OH	− OH

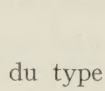
* Nous adoptons comme hypothèse de travail des formules en C_{88} pour les acides mycoliques méthoxylés, et en C_{87} pour ceux qui sont dépourvus de méthoxyle.

mycoliques donnent un *acide anhydro-mycolique* apparemment identique. Les acides α- et β-mycoliques sont donc vraisemblablement des stéréo-isomères[1]. Il n'est pas possible d'affirmer que les deux acides sont des substances pures, mais des chromatographies répétées de ces substances et de divers dérivés n'ont pas décelé d'inhomogénéité. Il semble d'ailleurs qu'Anderson ait isolé des fractions analogues, puisque Gerstl, Tennant et Pelzman[2] mentionnent des essais biologiques sur deux préparations d'acide mycolique fournies par Anderson et fondant respectivement à 55-56°C et 73-75°C.

La formule $C_{88}H_{176}O_4$ est actuellement la plus probable; elle est à ±5 C et ±10 H exacte; les méthodes analytiques ne permettent pas de précision plus grande[3].

Nos acides présentent pour la première fois des teneurs en méthoxyle concordant avec les chiffres théoriques (tabl. III); l'acide mycolique d'Anderson devait en effet consister en un mélange d'acides méthoxylés et non méthoxylés, comme nous en avons récemment isolés de certaines souches (voir tabl. IV).

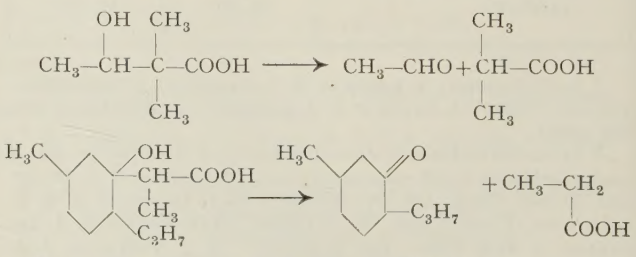
Les acides anhydro-mycoliques (IV) présentent dans leur spectre ultra-violet une forte bande d'absorption vers 220 mμ, caractéristique de la conjugaison de la double liaison avec le carboxyle. La présence d'une



double liaison du type C–C=C–C a été également mise en évidence par le spectre d'absorption infrarouge (bande à 1645 cm^{-1} qui manque dans les acides mycoliques). Deux positions pouvaient alors être envisagées pour l'hydroxyle des acides mycoliques: soit en α, soit en β, par rapport au carboxyle. Nous avons pu prouver que l'hydroxyle n'est pas en α: en effet, les acides mycoliques ne sont pas décarboxylés par le tétracétate de plomb, dans les conditions où les acides β-hydroxylés le sont; d'autre part, les alcools mycoliques ne sont pas coupés par l'acide periodique comme les 1,2-glycols.

Enfin, nous avons prouvé que l'hydroxyle est en β[1]; l'acide α-mycolique (de souche *Test*) fournit en effet par oxydation chromique ménagée une cétone décarboxylée (II), comme le montre l'analyse élémentaire et le spectre d'absorption. D'après une nomenclature ayant pour base le *mycolane*, hydrocarbure $C_{87}H_{176}$ correspondant à l'acide mycolique, nous appelons cette cétone *méthoxynor-mycolanone*. Par oxydation dans les mêmes conditions d'α-mycolate de méthyle, nous avons obtenu un ester β-cétonique (III), qui par saponification redonne la cétone décarboxylée (II)[1]. Ces faits sont en accord avec la *position en β de l'hydroxyle*.

Un tel résultat n'était compatible avec la libération d'acide *n*-hexacosanoïque par pyrolyse que si l'on admettait la présence d'une ramification en C_{24} sur le carbone α (I). Il est en effet connu depuis longtemps que des acides β-hydroxylés, porteurs en position α d'une ou de deux ramifications[2], sont scindés par pyrolyse d'une manière analogue:



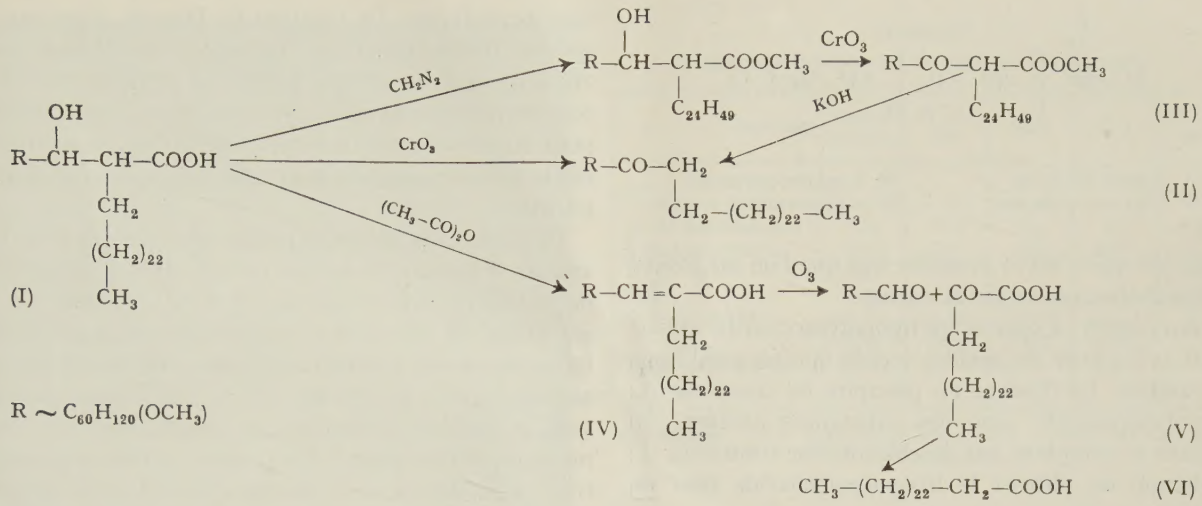
[1] Note ajoutée à la correction des épreuves (20/7/1951): Dans une note récente (J. Asselineau, E. Ganz et E. Lederer, C. r. Acad. Sci. *232*, 2050 [1951]), nous avons montré que les acides α- et β-mycoliques diffèrent par leur reste *R* et ne sont pas nécessairement des isomères. Les acides α- et β-anhydro-mycoliques ne sont pas identiques, d'après les spectres infra-rouges (voir formules p. 285).

[2] B. Gerstl, R. Tennant et O. Pelzman, Amer. J. Path. *21*, 1007 (1945).

[3] Pour une discussion détaillée de cette question voir J. Asselineau et E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta *7*, 126 (1951).

[1] J. Asselineau, C. r. Acad. Sci. *230*, 1620 (1950).

[2] H. Schnapp, Ann. Chem. *201*, 62 (1880). – O. Wallach, Ann. Chem. *365*, 255 (1909).



Nous avons pu effectivement prouver l'existence d'une ramification en C_{24} sur le carbone α par ozonisation de l'acide anhydro-mycolique (IV), et isolement d'acide *n*-pentacosanoïque (VI), formé à partir de l'acide α-céto-hexacosanoïque (V) attendu. Les acides mycoliques *Test* sont donc des acides β-hydroxylés, possédant en α du carboxyle une chaîne aliphatique normale en C_{24}[1].

Ces résultats nous ont conduit à définir les acides mycoliques comme «*acides gras à haut poids moléculaire, hydroxylés en β et portant en α une longue chaîne aliphatique*»[2]. Il existe d'autres ramifications, puisque le dosage de C—CH_3 d'après Kuhn et Roth donne environ quatre molécules d'acide acétique (pour l'acide mycolique *Test*).

Avec H. Demarteau[3], nous avons isolé des acides α- et β-mycoliques à partir des souches *H-37 Rv* et *H-37 Ra*; l'acide α-mycolique de *H-37 Ra* est dépourvu de méthoxyle et contient deux hydroxyles acétylables (tabl. IV). Asselineau[4] a étudié les acides mycoliques isolés des souches R_1 *et L-25*, et montré que ces acides possèdent le même type de structure (I). A partir de la *souche bovine Vallée*, Demarteau[5] a isolé trois acides mycoliques différents; des acides analogues existant dans les souches bovines *Marmorek* et BCG sont en cours d'étude (tabl. V). Asselineau[6] a montré la présence d'acides mycoliques du même type dans trois souches de bacilles paratuberculeux (*souche Bruynoghe et Adant*, une souche isolée de l'eau de Seine, et *M. agreste*).

B. – *Complexes lipopolysaccharidiques.* Haworth[7] a préparé, avec Stacey, un complexe à haut poids moléculaire par extraction de bacilles secs par de l'urée ou de la β-hydroxy-propionamidine[1]. L'hydrolyse de ce complexe (renfermant 8% de N et qui aurait des propriétés antigéniques), donne les produits suivants: acide désoxy-ribonucléique (3%), peptides (6%), aminopolysaccharides (30%), lipides (57%; contenant de l'acide mycolique).

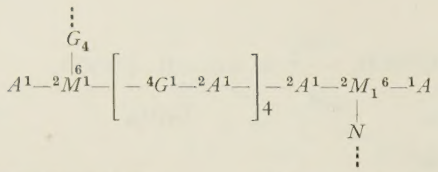
Tableau V
Acides mycoliques de souches bovines

Acide mycolique Souche	Point de fusion	Formule probable	Fonctions OH	Fonctions OCH_3
Vallée[2] α . . .	67°	$C_{87}H_{174}O_3$	1	0
β . . .	56°	$C_{88}H_{176}O_4$	1	1
γ . . .	64°	$C_{87}H_{174}O_4$	2	0
BCG[3]				
α cires libres	58°	$C_{87}H_{174}O_3$	1	0
ψ lipides liés	70°	$C_{87}H_{174}O_4$	2	0
ω lipides liés	53°	$C_{87}H_{174}O_3$	1	0

Haworth, Kent et Stacey[4] ont étudié en détail la structure du polysaccharide. Après méthylation et hydrolyse acide, ces auteurs ont isolé les produits suivants: triméthyl-2,3,5-méthyl-D-arabofuranoside (12,8 %), diméthyl-3,5-méthyl-D-arabofuranoside (30,9%), triméthyl-2,3,6-méthyl-D-galactopyranoside (33,8%), diméthyl-3,4-méthyl-D-mannopyranoside (14,4%) et un diméthyl-méthyl-D-glucosaminide (8%). Ceci amène les auteurs à attribuer à ce polysaccharide une structure ramifiée, indiquée ci-dessous.

[1] J. Asselineau et E. Lederer, Nature *166*, 782 (1950); Biochim. Biophys. Acta *7*, 126 (1951).
[2] J. Asselineau et E. Lederer, Biochim. biophys. acta *7*, 126 (1951).
[3] J. Asselineau, H. Demarteau et E. Lederer, C. r. Acad. Sci. *230*, 877 (1950).
[4] J. Asselineau, Essais inédits.
[5] H. Demarteau, C. r. Acad. Sci. *232*, 2494 (1951).
[6] J. Asselineau, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).
[7] W. N. Haworth, J. Chem. Soc. *1947*, 585.

[1] Notons que Haworth et ses collègues, ainsi que Choucroun, ont travaillé sur des bactéries tuées par la chaleur; nous avons évité l'action de la chaleur en plaçant d'après Anderson les bacilles vivants dans un mélange d'alcool et d'éther.
[2] H. Demarteau, C. r. Acad. Sci. *232*, 2494 (1951).
[3] Résultats inédits de A. Ginsburg.
[4] W. N. Haworth, P. W. Kent et M. Stacey, J. Chem. Soc. *1948*, 1220.



A D-arabofuranose *M* D-mannopyranose
G D-galactopyranose *N* D-glucosamine

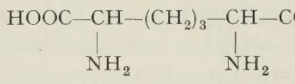
Notons que c'est la première fois que l'on ait trouvé le D-arabofuranose dans la nature.

Choucroun[1] a obtenu un lipopolysaccharide appelé «Pmko» à partir de bacilles séchés, épuisés par l'huile de vaseline. Le dioxane en précipite un complexe du lipopolysaccharide avec des substances azotées. En traitant ce complexe par du chloroforme contenant du méthanol, on obtient le lipopolysaccharide brut en solution.

A partir des cires purifiées (préparées selon Anderson), Asselineau et Lederer[2] ont isolé une fraction insoluble dans l'acétone bouillante, qui présente à peu près les mêmes propriétés physiques et chimiques que la substance Pmko de Choucroun. Cette fraction est constituée par un lipopolysaccharide azoté et phosphoré qui n'est certainement pas encore pur; d'ailleurs, il est fractionnable par centrifugation à grande vitesse en solution dans l'éther de pétrole. Une telle fraction, isolée à partir de la souche humaine *Test*, renferme 1,0% d'azote et 0,12% de phosphore, et présente une acidité libre correspondant à 2 mm³ de potasse 0,1 N par milligramme[3].

Le poids moléculaire du lipopolysaccharide est d'environ 16 000.

Par saponification, ce lipopolysaccharide libère environ 50% de partie lipidique, constituée par 45% (par rapport au complexe initial) d'acide mycolique et 5% d'acides gras de poids moléculaire moyen 280[4]. Le reste de la molécule consiste en un polysaccharide renfermant tout l'azote du lipopolysaccharide et le phosphore. Environ un quart de cet azote se trouve sous forme ammoniacale; le reste est principalement dû à la présence de trois acides aminés[5]: l'*acide glutamique*, l'*alanine*, et un nouvel acide aminé: l'acide *α,ε-diaminopimélique*, isolé par Work du bacille diphtérique[6].



D'après des dosages d'azote aminé, il est vraisemblable que ces trois acides aminés sont engagés dans des liaisons peptidiques. La réaction de Dische, ainsi que le spectre d'absorption du polysaccharide (bande vers 265 mμ), montre qu'une partie du phosphore est liée sous forme d'acide désoxyribonucléique, qui constitue peut-être seulement une impureté. Nous avons trouvé des résultats analogues pour une préparation de Pmko purifié[1].

Le poids moléculaire du polysaccharide (que Raffel[2] appelle *W*) serait d'environ 7000 à 8000. Comme celui de Haworth, Kent et Stacey[3], il est constitué par du galactose, du mannose et de l'arabinose; mais il renferme beaucoup moins d'azote que celui décrit par ces auteurs[3] (1,4% au lieu de 4,7%). D'ailleurs, nous n'avons pu mettre en évidence de glucosamine par chromatographie sur papier. Ces polysaccharides donnent, à très forte dilution, une précipitation avec des sérums d'animaux tuberculeux[4]. L'acidité du lipopolysaccharide peut être due à des groupes hydroxyles phosphoriques et au carboxyle libre de l'acide glutamique. L'acide mycolique est lié au polysaccharide, sous forme d'ester, par son carboxyle. Une réduction par $LiAlH_4$ détache l'acide mycolique sous forme d'alcool mycolique[5]. Des analogies assez étroites existent entre notre lipopolysaccharide et une fraction «*infiltrable*» isolée par Anderson, Reeves et Stodola[6] des lipides liés de bacilles de souche humaine *A-10*[7].

Les caractéristiques de lipopolysaccharides isolés d'un certain nombre de souches de mycobactéries sont mentionnées dans les tableaux VI et VII. On peut voir que toutes les souches humaines virulentes étudiées renferment un tel lipopolysaccharide à haut point de fusion, caractérisé par la présence des mêmes trois acides aminés[8] (voir fig. 1). Les lipopolysaccharides isolés de *H-37Ra* (avirulent) et de souches bovines ou de BCG en sont exempts[9]. Cependant ces bacilles renferment de l'acide α,ε-diamino-pimélique; Gendre et Lederer[10] ont en effet mis au point une méthode permettant la détection et le dosage semi-quantitatif de cet acide aminé. Appliquant cette méthode à des hydrolysats de bacilles entiers de 15 souches de mycobactéries (5 humaines, 4 bovines, 1 aviaire et 5 paratuberculeuses),

[1] N. Choucroun, C. r. Acad. Sci. *210*, 749 et 511 (1940); Amer. Rev. Tuberc. *56*, 203 (1947).

[2] J. Asselineau et E. Lederer, Bull. Soc. chim. biol. *31*, 492 (1949).

[3] J. Asselineau, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).

[4] J. Asselineau, C. r. Acad. Sci. *229*, 791 (1949).

[5] J. Asselineau, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950). – J. Asselineau, N. Choucroun et E. Lederer, Biochim. biophys. acta *5*, 197 (1950).

[6] E. Work, Bull. Soc. chim. biol. *31*, 138 (1949); Biochim. biophys. acta *5*, 204 (1950); Nature *165*, 74 (1950).

[7] Notre lipopolysaccharide est cependant facilement filtrable sur bougie Chamberland L3.

[8] J. Asselineau et E. Lederer, C. r. Acad. Sci. *230*, 142 (1950).

[9] Il convient de faire remarquer ici que, contrairement à ce qui avait été avancé dans notre note (8), le lipopolysaccharide de BCG ne renferme pas d'acides aminés; les «nombreux acides aminés» mentionnés provenaient de débris bacillaires encore présents dans notre préparation.

[10] T. Gendre et E. Lederer, Biochim. biophys. acta 1951, sous presse.

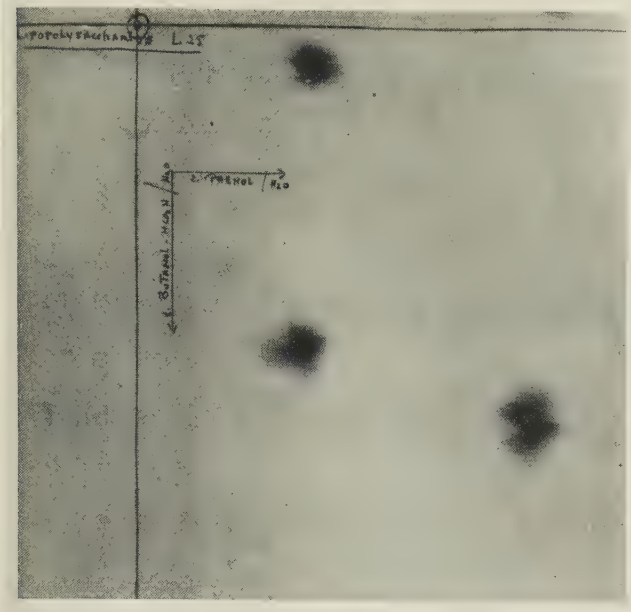


Fig. 1. Chromatographie sur papier d'un hydrolysat du lipopolysaccharide de la souche humaine *L 25* (isolée d'une lésion lupique); les trois taches correspondent à l'acide α,ε-diaminopimélique, l'acide glutamique et l'alanine (de haut en bas).

ils ont trouvé des teneurs en acide diaminopimélique de 0,2 à 0,7% du poids sec des bacilles. *Toutes les souches de mycobactéries* en contiennent; il ne semble pas y avoir de différence quantitative suivant la virulence des bacilles.

3° *Rapport entre la virulence des bacilles et les fractions lipidiques*

Examinant la composition des lipides des deux variants *Rv* et *Ra* de la souche humaine *H-37*, Martin[1] a observé que la souche virulente *Rv* renferme deux fois plus de lipides que la souche avirulente *Ra*.

Rapport entre virulence et lipopolysaccharide. Au cours d'une étude systématique des lipopolysaccharides isolés d'un certain nombre de souches humaines et bovines, Asselineau et Lederer[2] ont remarqué un parallélisme entre la virulence d'une souche et sa teneur en lipopolysaccharide (voir tabl. VI et VII). (Le cas des souches *L-25* et *L-65*, d'origine lupique, est plus difficile à interpréter; aux essais de virulence habituels, ces deux souches se sont comportées comme avirulentes, mais il faut tenir compte de ce que le lupus n'a jamais pu être reproduit expérimentalement).

En plus des différences entre *H-37-Rv* (virulent) et *H-37-Ra* (avirulent) marquées dans le tableau VI, nous avons observé que *H-37-Rv* contient 0,5% du poids sec des bacilles en cires solubles dans l'acétone bouillante, consistant en 68% d'acide mycolique libre, tandis que *H-37-Ra* contient 5,6% de ces cires et qui sont presque exemptes d'acide mycolique libre.

[1] G. Martin, J. Amer. Chem. Soc. *60*, 768 (1938).
[2] J. Asselineau et E. Lederer, C. r. Acad. Sci. *230*, 142 (1950).

Tableau VI

Lipopolysaccharides de diverses souches humaines

Souches	Aesch-bacher	*H-37-Rv*	Test	*R-1*	*H 37-Ra*
Virulence . . .	+ + +	+ + +	+ +	+	–
% de bacilles secs	7,6	7,3	6,2	2,1	0,54
Point de fusion .	223°	225°	230°	215°	57°
N%	1,22	1,1	1	1,0	traces
P%	0,34	0,18	0,11	–	0,37
Acides aminés .	Al. Gl. Pim.	Al. Gl. Pim.	Al. Gl. Pim.	Al. Gl. Pim.	0
Réaction Dubos	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	–

Al. = Alanine. Gl. = Acide glutamique. Pim. = Acide α-ε-diaminopimélique.

Etant donné que les souches bovines *Vallée*, *Dupré* et *Marmorek* sont également virulentes, mais contiennent des lipopolysaccharides dépourvus d'acides aminés, il ne semble pas que ces amino-acides jouent un rôle essentiel dans la virulence (tabl. VII).

Tableau VII

Lipopolysaccharides de souches

	Bovines			humaines isolées de lésions lupiques	
Souches	Vallée	Mar-morek	BCG	*L-25*	*L-65*
Virulence . . .	+	+ +	–	?	?
% de bacilles secs	0,56	2,8	1,6	4,5	1,3
Point de fusion .	160-170°	193-196°	140-170°	175-185°	175-185°
N%	0,24	0,11	0,33	1,01	0,60
P%		0,1	0,2		0,25
Acides aminés .	0	0	0*	Al. Gl. Pim.	Al. Gl. Pim.

Al. = Alanine. Gl. = Acide glutamique. Pim. = Acide α-ε-diaminopimélique.

* Voir note 9 page 286.

Les résultats de ce tableau proviennent d'essais inédits de J. Asselineau et H. Demarteau.

Réaction de Dubos et Middlebrook. Dubos et Middlebrook[1] ont décrit une réaction permettant de distinguer les souches virulentes et avirulentes. Les bacilles, mis en suspension dans un tampon alcalin et additionnés de rouge neutre, se colorent en rouge s'ils sont virulents, en jaune s'ils sont avirulents. Hauduroy et Posternak[2] confirment la valeur de cette réaction. En appliquant la réaction de Dubos à nos fractions de cires, nous avons trouvé que l'acide mycolique se colore en rose et que le lipopolysaccharide des souches humaines virulentes se colore en rouge intense. Les fractions analogues des souches avirulentes se colorent plus faiblement[3].

[1] R. J. Dubos et G. Middlebrook, Amer. Rev. Tuberc. *58*, 698 (1948).
[2] P. Hauduroy et Y. Posternak, Ann. Inst. Pasteur *77*, 91 (1949); C. r. Acad. Sci. *228*, 781 (1949).
[3] J. Asselineau et E. Lederer, C. r. Acad. Sci. *230*, 142 (1950.)

La fixation du colorant basique peut s'expliquer par salification des groupes acides du lipopolysaccharide.

Cord factor. Dubos et Middlebrook[1], reprenant une vieille observation de Koch, ont montré que l'orientation des bacilles en cordes dans les cultures est caractéristique des souches virulentes et du BCG; les souches avirulentes ne forment que des amas irréguliers de bacilles. Boehm[2] a montré que ces cordes sont biréfringentes.

Partant de l'hypothèse de l'existence dans les bacilles virulents d'un facteur chimique responsable de la formation des cordes, Bloch[3] a isolé par extraction à l'éther de pétrole de bacilles virulents et jeunes (souche *H-37-Rv*), une fraction lipidique, qu'il appelle *cord factor*. Les bacilles extraits restent vivants, mais ont perdu la capacité de former des cordes, et en outre leur virulence. Le *cord factor* possède des propriétés toxiques vis-à-vis de la souris, après une deuxième injection, et la faculté d'inhiber la migration des leucocytes *in vitro*. Il semble toutefois que la propriété de formation de cordes et la toxicité soient dues à deux facteurs distincts, le *cord factor* étant un mélange de plusieurs substances.

4° *Propriétés biologiques des fractions lipidiques*

A. – *Production de tubercules.* Sabin[4] a montré en 1930 que l'injection de phosphatides extraits du bacille tuberculeux entraîne la production de tubercules; c'est à l'acide phthioïque de cette fraction qu'a été attribuée cette propriété. Cependant, Roulet et Bloch[5] ont observé que les acides phosphatidiques de Bloch[6] sont plus actifs que l'acide phthioïque lui-même. L'activité d'acides gras synthétiques se rapprochant plus ou moins du type phthioïque a donné lieu à de nombreux travaux, qui ont été exposés récemment par Robinson[7] et par Weitzel[8].

Cependant, les phosphatides ne sont pas les seules fractions lipidiques responsables de la formation de cellules géantes: Gerstl, Tennant et Pelzman[9] ont montré que les acides mycoliques possèdent aussi cette propriété. Delaunay a obtenu des résultats semblables avec nos lipopolysaccharides[10]. La formation de cellules géantes semble être une propriété générale d'acides gras ayant plusieurs ramifications.

B. – *Formation d'anticorps.* Le phosphatide préparé par Anderson possède également des propriétés antigéniques[1]. D'autres préparations, telles que celle de Machebœuf et Faure[2] (pratiquement exempte d'azote) ne sont plus qu'haptènes. Cette question a été traitée par Pangborn[1] dans le cadre des antigènes lipidiques.

L'antigène méthylique de Boquet et Nègre est une fraction extraite par l'alcool méthylique de bacilles préalablement dégraissés par l'acétone; son activité doit d'ailleurs être due à la présence de phosphatides (voir pour ses propriétés Nègre[3]).

Choucroun[4] pense que son lipopolysaccharide *Pmko* est antigénique et pourrait servir à des immunisations en remplacement du BCG. De même, Haworth attribue des propriétés antigéniques au complexe lipopolysaccharidique azoté qu'il a isolé[5] (voir page 285).

C. – *Toxicité.* Bloch a montré que le *cord factor* est toxique pour la souris, lorsqu'une seconde injection est effectuée; une seule injection, même à dose élevée, est sans action. Nègre[3] rapporte des faits analogues avec des extraits acétoniques de bacilles humains, actifs seulement après plusieurs injections. Des extraits acétoniques de bacilles paratuberculeux (*M. phlei*) sont inoffensifs dans les mêmes conditions.

Nos lipopolysaccharides sont dépourvus de toute toxicité; ce fait a été établi par Raynaud[6] et par Bloch[6].

D. – *Etablissement de l'hypersensibilité retardée.* Cette question a été traitée très en détail par Raffel[7] dans cette revue. Lui, ainsi que Choucroun[4] ont montré le rôle joué dans l'établissement de ce phénomène par les cires, et plus particulièrement par le lipopolysaccharide Pmko.

E. – *Inhibition de la migration des leucocytes.* Allgöwer et Bloch[8] ont montré que la migration des leucocytes ayant phagocyté des bacilles tuberculeux virulents, est inhibée *in vitro*, alors que les bacilles avirulents sont sans action. Depuis, Bloch[9] a montré que le *cord factor* est responsable de cette inhibition.

Delaunay, Choucroun, Bazin et Robineau[10] ont étudié le chimiotactisme présenté par les leucocytes pour des grains d'amidon. Ces auteurs ont constaté que des bacilles virulents (*H-37-Rv*) inhibent le chimiotactisme après phagocytose, mais que des bacilles avirulents (*H-37-Ra*) sont susceptibles de l'inhiber

[1] G. Middlebrook, R. J. Dubos et C. H. Pierce, J. Exp. Med. *86*, 175 (1947).
[2] G. Boehm, Exper. *5*, 445 (1949).
[3] H. Bloch, Amer. Rev. Tuberc. *61*, 270 (1950); J. Exp. Med. *91*, 197 (1950).
[4] F. R. Sabin, C. A. Doan et C. E. Forkner, J. Exp. Med. *52*, suppl. 3 (1930).
[5] F. Roulet et K. Bloch, Virchows Arch. *298*, 311 (1936).
[6] K. Bloch, Z. physiol. Chem. *224*, 1 (1936); Biochem. Z. *285*, 372 (1936).
[7] R. Robinson, Nature *158*, 816 (1946).
[8] G. Weitzel, Angew. Chem. *60*, 263 (1948).
[9] B. Gerstl, R. Tennant et O. Pelzman, Amer. J. Path. *21*, 1007 (1945).
[10] A. Delaunay, J. Asselineau et E. Lederer, C. r. Soc. Biol. 1951, sous presse.

[1] M. C. Pangborn, Discussions Faraday Soc. *6*, 110 (1949).
[2] M. A. Machebœuf et M. Faure, C. r. Acad. Sci. *209*, 700 (1939).
[3] L. Nègre, *Les lipoïdes dans les bacilles tuberculeux et la tuberculose* (Masson, Paris 1950).
[4] N. Choucroun, C. r. Acad. Sci. *210*, 749 et 511 (1940); Amer. Rev. Tuberc. *56*, 203 (1947).
[5] W. N. Haworth, J. Chem. Soc. *1947*, 585.
[6] Essais inédits.
[7] S. Raffel, Exper. *6*, 410 (1950).
[8] M. Allgöwer et H. Bloch, Amer. Rev. Tuberc. *59*, 562 (1949).
[9] H. Bloch, Amer. Rev. Tuberc. *61*, 270 (1950); J. Exp. Med. *91*, 197 (1950).
[10] N. Choucroun, A. Delaunay, S. Bazin et R. Robineaux, C.r. Acad. Sci. *232*, 1325 (1951).

aussi, si la phagocytose a été massive; il n'y a donc entre les deux variétés de bacilles qu'une différence quantitative. En outre, ces auteurs ont montré que le lipopolysaccharide Pmko possède la propriété d'inhiber le chimiotactisme, ainsi que notre lipopolysaccharide.

5° *Acido-résistance*

Les mycobactéries sont très difficiles à colorer par les méthodes et colorants habituels, mais chauffées pendant quelques minutes avec une solution de fuchsine phéniquée, elles sont colorées en rouge foncé et résistent à la décoloration par l'alcool acide; c'est ce phénomène, découvert par Paul Ehrlich, que l'on appelle *acido-résistance* et qui sert aux bactériologistes pour le dépistage des mycobactéries. L'explication de l'acido-résistance est encore très controversée.

Depuis qu'Anderson a montré que l'acide mycolique est le seul constituant acido-résistant du bacille tuberculeux, on pouvait croire le problème résolu, mais il n'en est rien. Car l'acido-résistance du bacille est détruite par simple broyage, ou par ébullition avec de l'acide chlorhydrique dilué[1], traitements qui ne détruisent pas l'acide mycolique. De plus, nous avons trouvé[2] (ainsi qu'Anderson et Fethke[3]) que les esters de l'acide mycolique ne sont pas acido-résistants; or, la plus grande partie de l'acide mycolique se trouve dans le bacille sous forme estérifiée, liée à des polysaccharides.

En ce qui concerne l'acido-résistance de l'acide mycolique, nous avons montré, en étudiant plusieurs de ses dérivés, que la présence d'un carboxyle libre et de son hydroxyle est nécessaire; l'acide anhydro-mycolique n'est plus acido-résistant; les deux acides α- et β-mycoliques sont acido-résistants. Nous pensons que la fuchsine, colorant basique, est fixée par le carboxyle et par une valence secondaire sur l'hydroxyle en β.

Bien qu'ayant montré la présence d'acide mycolique libre dans certaines souches de bacilles virulents, et l'existence de certaines fractions de cires, dans lesquelles l'acide mycolique est *libéré* au cours du chauffage avec le colorant, nous avons conclu que ces fractions, d'importance pondérale relativement faible, pouvaient difficilement être responsables de l'acido-résistance du bacille entier.

Il semble que les observations de Yegian et Vanderlinde[4] faisant intervenir la perméabilité cellulaire, apportent la clé du problème. D'après ces auteurs, la plus grande partie du colorant se trouve à l'état libre, à l'intérieur de la cellule; il y a été introduit au cours du chauffage avec la fuchsine phéniquée, et les cellules étant imperméables à l'alcool acidulé à froid, le colorant y reste emprisonné; il peut cependant en être enlevé par l'alcool bouillant. Les cellules ainsi décolorées peuvent être recolorées à nouveau. On comprend dès lors qu'un simple broyage suffise à détruire l'acido-résistance du bacille entier[1], broyage qui ne détruit évidemment pas l'acide mycolique.

Certaines souches de bacilles paratuberculeux peuvent perdre leur acido-résistance; dans une de ces souches, Asselineau[2] a montré l'existence d'un acide mycolique acido-résistant. Ceci vient à l'appui de notre thèse d'après laquelle l'acide mycolique n'a pas nécessairement un rôle direct à jouer dans l'acido-résistance du bacille entier.

On peut objecter à toutes ces recherches qu'elles sont effectuées sur des bacilles cultivés depuis de longues années sur des milieux synthétiques. Il est indéniable que ce traitement a modifié la composition des bacilles. D'ailleurs, Anderson et ses collaborateurs[3] n'ont pas pu mettre en évidence d'acide phthioïque ou de phthiocol dans les extraits lipidiques de lésions tuberculeuses pulmonaires. Il est certain qu'il serait très intéressant d'étudier la composition chimique de bacilles fraichement isolés de lésions et cultivés dans des conditions se rapprochant le plus possible de celles existant dans les organes des mammifères.

Nous tenons à remercier le Professeur J. Trefouël, Directeur de l'Institut Pasteur, et le Dr J. Bretey, Chef de service, qui nous ont accordé toutes facilités pour l'approvisionnement en bacilles. Nous remercions également la Ella Sachs Plotz Foundation for the Advancement of Science (Boston), et la Fondation Waksman pour le développement des Etudes microbiologiques en France, pour des subventions ayant facilité notre travail.

Summary

After a short general survey of recent research on the lipids of mycobacteria, a more detailed treatment is given of the chemistry of the mycolic acids, which make up 8·3% of the dry weight of the human virulent strain studied. Chromatography separates them into two acids (α and β, table II). The elementary analysis of the two mycolic acids and of a number of their derivatives confirms the molecular formula $C_{88}H_{176}O_4$ proposed by Anderson in 1938 (table III). Taking into account the difficulties inherent in the analysis of compounds of high molecular weight, this formula can be considered only as being the most probable one.

The hydroxyl group of the mycolic acids is in the β-position with respect to the carboxyl group. The mycolic acids of the two virulent human strains studied in detail have an unbranched side chain of 24 carbon atoms in the α-position. The pyrolysis of mycolic acid, which leads to *n*-hexacosanoic acid, is a reaction characteristic of β-hydroxy-acids having a side chain in the α-position.

Mycolic acids, at least one of which is present in all the strains of mycobacteria examined up to now (table IV, V), are defined as β-hydroxy-acids of high molecular

[1] H. Sherman, J. Inf. Diseases *12*, 249 (1913). – T. H. Benians, J. Path. Bact. *17*, 199 (1912–1913).

[2] J. Asselineau et E. Lederer, Bull. Soc. chim. biol. *31*, 492 (1949).

[3] N. Fethke et R. J. Anderson, Amer. Rev. Tuberc. *57*, 294 (1948).

[4] D. Yegian et R. J. Vanderlinde, J. Bact. *54*, 777 (1947).

[1] H. Sherman, J. Inf. Diseases *12*, 249 (1913). – T. H. Benians, J. Path. Bact. *17*, 199 (1912–1913).

[2] J. Asselineau, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).

[3] R. J. Anderson, R. E. Reeves, M. M. Creighton et W. C. Lothrop, Amer. Rev. Tuberc. *48*, 65 (1943).

weight which contain a long aliphatic side chain in the α-position.

The mycolic acids are mostly linked up, in the bacilli within acetone-insoluble lipopolysaccharides of high molecular weight. Human virulent strains differ from others by containing three characteristic amino acids in their lipopolysaccharide (alanine, glutamic acid, and α,ε-diamino-pimelic acid) (fig. 1). The percentage of this N-containing lipopolysaccharide seems to be roughly parallel to the virulence of the strains (tables VI, VII).

The last chapter discusses the biological properties of the different lipid fractions. Particular attention is paid to the cord factor of H. Bloch and to the problem of acid-fastness.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschließlich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

o-Quinones as Dienophiles

In view of the recent publication[1] concerning the reactions between *o*-quinones and olefines, we would like to state our results. Full details will be published elsewhere.

o-Benzoquinone in ether reacts rapidly with excess *cyclo*-pentadiene to give a pale yellow, rather unstable adduct of the formula $C_{17}H_{14}O_4$; i. e. two molecules of quinone to one of diene.

Dissolved in dry ether, tetrabrom-*o*-benzoquinone reacts rapidly with *cyclo*pentadiene at room temperature, to give 3 products:

(1) This is deposited from the reaction mixture in 26% yield. It is a diketone, m. p. 205° (dec.), giving a quinoxaline m. p. 215° (dec.). This quinoxaline has also been described by Horner and Merz[1] (l. c.). The diketone readily adds water to give a colourless, thermally unstable hydrate.

(2) The benzdioxan derivative described by the above authors, m. p. 122° from ethanol; crystallised from benzene it forms solvated crystals, m. p. 96°, which effloresce in air. Yield—30%.

(3) A very small amount of a yellow substance, m. p. 140°, of the same empirical formula as 1, but in contrast to it, containing reactive bromine. On heating above its melting point it rearranges to give 1.

A quantity of tar is formed as well.

In suspension in acetone, 4-acetylamino-*o*-benzoquinone adds *cyclo*pentadiene to give a yellow, thermally unstable adduct, m. p. *c.* 145°(dec.), of formula $C_{13}H_{13}O_3N$. This fails to give a quinoxaline, but is readily converted by dilute alkali to a colourless isomer, m. p. 200° (dec.), which gives the characteristic colour reactions of catechol, and can readily be oxidised to a red substance.

An attempt to add butadiene to tetrabrom-*o*-benzoquinone in ether at 100° gave a very small amount of a colourless, unidentified substance. Attempts to add butadiene to the other two quinones, and an attempt to add furan to *o*-benzoquinone failed.

J. A. Barltrop and John A. D. Jeffreys

The Dyson Perrins Laboratory, Oxford, December 30, 1950.

[1] L. Horner and M. Merz, Ann. Chem. *570*, 89 (1950).

Zusammenfassung

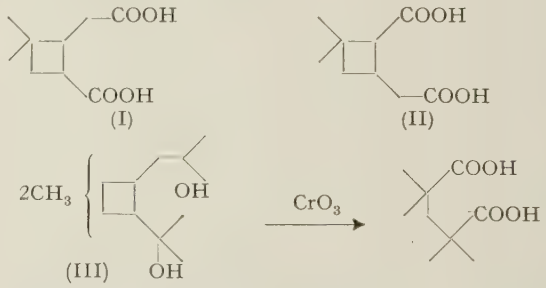
Beim Zusatz von *Cyclo*pentadien zu *o*-Benzochinon entsteht eine Verbindung, in welcher zwei Moleküle von Chinon an einem Molekül von Dien gebunden sind. Butadien und Furan werden nicht addiert.

*Cyclo*pentadien gibt mit Tetrabrom-*o*-benzochinon drei Stoffe; ein Diketon, ein Benzdioxan und einen dritten Stoff von unbekannter Bauart. Bei Verwendung von Butadien haben wir nur Spuren eines Produktes gefunden.

4-Acetylamino-*o*-benzochinon addiert *Cyclo*pentadien unter Bildung eines Diketones, welches beim Zusatz von Natronlauge sehr glatt in ein Catechol übergeht. Butadien reagiert nicht.

Zur Konstitution der Caryophyllensäure

In der Literatur ist die Ansicht vertreten worden, daß eine Entscheidung zwischen den auf Grund des oxydativen Abbaus[1] für die Caryophyllensäure in Frage kommenden Konstitutionsformeln (I) und (II) nur durch Synthese möglich sei.



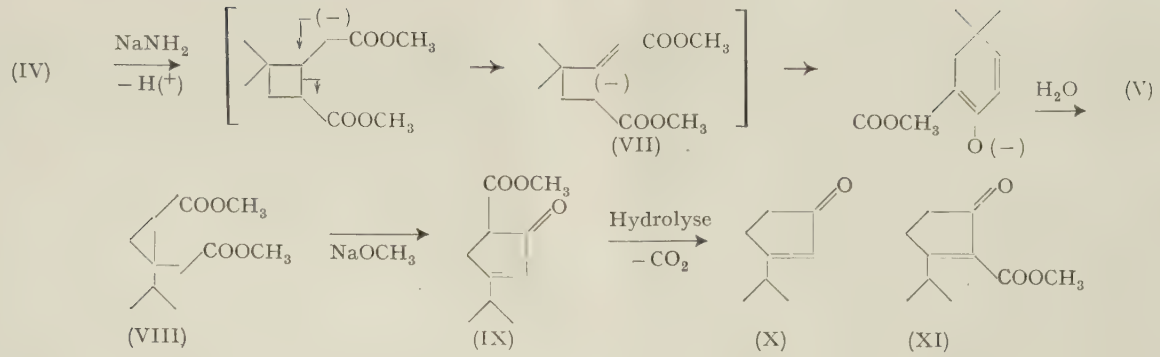
D. H. R. Barton[2] hat hingegen kürzlich darauf hingewiesen, daß die Oxydation des Tetramethylglykols III zu α,α,α′,α′-Tetramethylglutarsäure[3] für die Caryophyllensäure die Formel (II) ausschließt. In Übereinstimmung damit haben F. L. Dawson und G. R. Ramage[4] fest-

[1] W. C. Evans, G. R. Ramage und J. L. Simonsen, J. Chem. Soc. London *1934*, 1806. – L. Ruzicka und W. Zimmermann, Helv. chim. acta *18*, 219 (1935).

[2] D. H. R. Barton, J. org. Chem. *15*, 457 (1950).

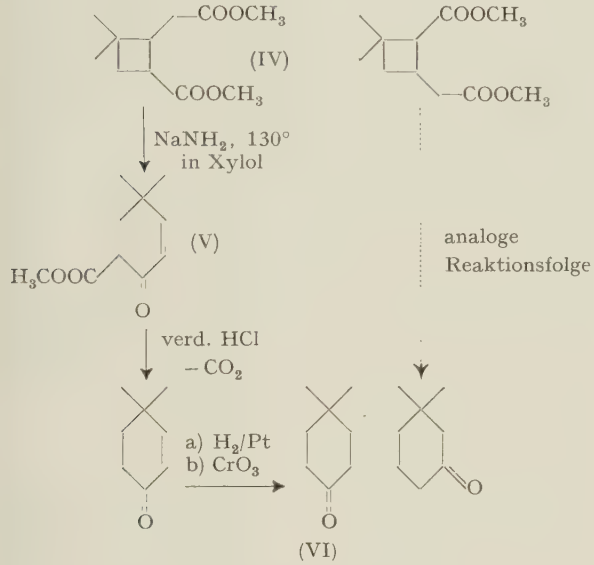
[3] L. Ruzicka, J. C. Bardhan und A. H. Wind, Helv. chim. acta *14*, 423 (1931).

[4] F. L. Dawson und G. R. Ramage, J. Chem. Soc., London *1950*, 3523.



gestellt, daß die synthetische (+)-trans-(2-Carboxy-3,3-dimethyl-cyclobutyl)-essigsäure (II) mit der natürlichen (+)-trans-Caryophyllensäure nicht identisch ist.

Auf dem im folgenden Reaktionsschema wiedergegebenen Wege konnte nun für die Konstitution (I) der Caryophyllensäure ein weiterer analytischer Beweis erbracht werden.



Das erhaltene Keton $C_8H_{14}O$ wurde in Form seines 2,4-Dinitrophenylhydrazons (Schmelzpunkt 146–147°) durch Mischprobe und Infrarot-Spektrum als VI identifiziert. (Mischschmelzpunkt mit dem bei 147–148° schmelzenden 2,4-Dinitrophenylhydrazon von authentischem 4,4-Dimethyl-cyclohexanon[1]: 146–147°. Die Mischprobe mit dem bei 136–137° schmelzenden 2,4-Dinitrophenylhydrazon von 3,3-Dimethyl-cyclohexanon[2] schmolz bei 110–115°.) Dieses Ergebnis schließt für die Caryophyllensäure die Konstitution II aus.

Der Übergang (IV)→(V) beruht auf einer umgekehrten *Michael*-Reaktion, bei der das als primäres Spaltprodukt anzunehmende mesomere Anion VII sekundär einen Ringschluß nach Dieckmann eingeht. Eine analog zu interpretierende Reaktionsfolge liegt wohl dem von O. Wallach[3] gefundenen Übergang von α-Tanacetondicarbonsäure-dimethylester (VIII) in einen ungesättigten Ketoester zugrunde, welcher bei der Hydrolyse unter Decarboxylierung Tanacetophoron (X) liefert. Diesem Ketoester, für den O. Wallach die Strukturformel XI annahm, ist auf Grund des hier angenommenen Reaktionsmechanismus die Konstitution IX zuzuschreiben.

Die Umkehrbarkeit der *Michael*-Kondensation ist sowohl theoretisch begründet als auch experimentell erwiesen[1]. Im Zusammenhang mit der Konstitutionsaufklärung von Naturstoffen bzw. deren Abbauprodukten wurde eine solche Spaltung wohl erstmals von R. B. Woodward, F. J. Brutschy und H. Baer[2] zur Erklärung des Überganges von Santorsäure in Santoronsäure angenommen. Die Möglichkeit einer nach dem Schema der umgekehrten *Michael*-Reaktion unter dem Einfluß starker Basen erfolgenden Spaltung ist bei 1,5-Dicarbonylverbindung geeigneter Konstitution ganz allgemein in Betracht zu ziehen. Darüber soll noch an anderer Stelle berichtet werden.

A. Eschenmoser und A. Fürst

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, den 31. März 1951.

Summary

Under the influence of sodium amide, caryophyllenic acid dimethylester undergoes an initial splitting which may be regarded as a reversed Michael-reaction. The intermediate then undergoes a cyclization to give an unsaturated β-keto-ester. The latter has been transformed by well-defined reactions into 4,4-dimethyl-cyclohexanone. This result is a further proof that, of the two possible structural formulas (I) and (II) for caryophyllenic acid, formula (I) is the correct one.

[1] Ch. K. Ingold und W. J. Powell, J. Chem. Soc. London *1921*, 1976.

[2] R. B. Woodward, F. J. Brutschy und H. Baer, Amer. Chem. Soc. *70*, 4216 (1948).

[1] R. F. Miller und R. Adams, Amer. Chem. Soc. *58*, 787 (1936).

[2] G. Büchi, O. Jeger und L. Ruzicka, Helv. chim. acta *31*, 241 (1948).

[3] O. Wallach, Liebigs Ann. Chem. *388*, 49 (1912).

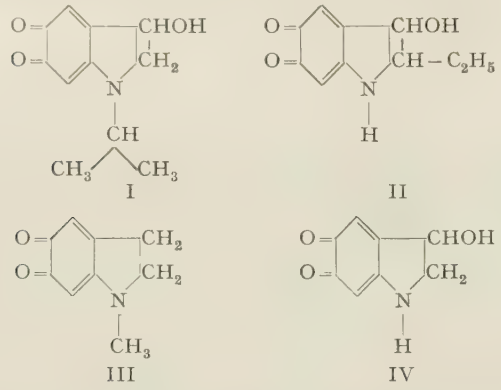
Substances nouvelles apparentées à l'adrénochrome

L'intérêt croissant que les physiologistes accordent aux amines sympathomimétiques et à leurs produits d'oxydation attire de plus en plus l'attention sur ces substances. On sait que l'oxydation diastasique de l'adrénaline permit à Green et Richter[1] d'obtenir l'adrénochrome et que la semicarbazone de ce dernier possède la propriété de raccourcir considérablement le temps de saignement pendant plusieurs heures[2]. Peu à peu, d'autres propriétés ont été découvertes à cette semicarbazone, notamment son activité vitaminique P et son action dynamogène.

[1] D. Green et D. Richter, Bioch. J. *31*, 596 (1937).

[2] J. Roskam et G. Derouaux, Arch. int. Pharm. Ther. *69*, 12 (1943).

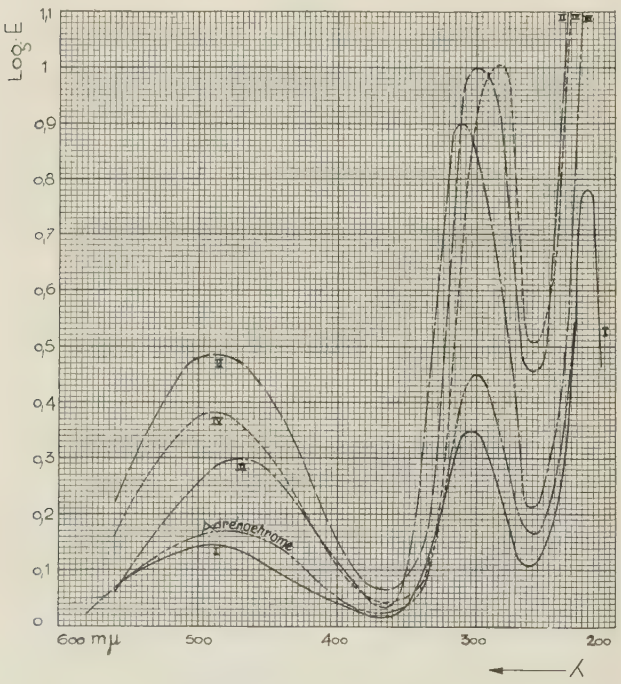
L'objet de cette note n'est pas de rappeler en détail les recherches qui ont été effectuées jusqu'à ce jour sur les produits du métabolisme de l'adrénaline et sur le rôle qu'on leur attribue; notre attention s'est portée sur la synthèse de substances apparentées à l'adrénochrome afin d'étudier le parallélisme qui peut exister entre l'activité de ces substances et celle des amines sympathomimétiques dont elles dérivent par oxydation.



I II III IV

Nous décrirons les propriétés des semicarbazones de l'isopropyl-1-noradrénochrome I et de l'éthyl-2-noradrénochrome II.

Jusqu'à présent, nous n'avons pu obtenir à l'état pur cristallisé les *o*-quinones (I et II), mais avons déterminé leurs spectres dans le visible et l'ultra-violet, et par là même confirmé leur similitude de structure avec l'adrénochrome. Au cours de la même étude physico-chimique, nous avons étudié les spectres des solutions aqueuses du désoxyadrénochrome (III) et du noradrénochrome (IV).



Préparation des o-quinones

On traite une solution aqueuse à 0,1 % de chlorhydrate d'amine par un excès d'oxyde d'argent (4 moles). Après 4 minutes d'agitation, l'excès d'Ag_2O et l'argent sont séparés par filtration. Les solutions examinées au spectromètre de Beckman sont amenées à la concentration de 0,005 %.

Semicarbazones

Les solutions aqueuses de quinones sont ajoutées à un excès (1,5 moles) de chlorhydrate de semicarbazide en solution aqueuse concentrée tamponnée par de l'acétate sodique. Les semicarbazones, peu solubles, sont purifiées par cristallisation dans l'eau bouillante:

Table I

Teneurs en azote	Trouvé	Calculé
Semicarbazone de I	21,1 %	21,2%
Semicarbazone de II	22,35%	22,4%

Action de l'hydrate sodique sur l'isopropyl-1-noradrénochrome

Si l'on traite une solution fraîche de quinone I par une solution aqueuse à 10 % de soude caustique, le mélange vire immédiatement du rouge au brun; l'acidification provoque la précipitation de cristaux jaune brun qui présentent la même fluorescence vert pomme que le trihydroxy-N-méthylindole. Le précipité, même à l'état sec, se décompose assez rapidement par oxydation en une substance partiellement soluble dans l'eau (solution orangé rouge); cette oxydation est réversible, le thiosulfate sodique fait réapparaître de nouveau la fluorescence verte.

Table II

Analyses spectrales

	Maxima	
I solution aqueuse	480 mμ 300 220	
I semicarbazone solution aqueuse 0,0005%	356 mμ	log *k* = 0,35
II solution aqueuse	490 mμ 296 227	
II semicarbazone solution aqueuse 0,0005%	350 mμ	log *k* = 0,44
III solution aqueuse	470 mμ 310 205	
IV solution aqueuse	490 mμ 310 205	
Adrénochrome	480 mμ 300 220	
Semicarbazone de l'adrénochrome. Solution aqueuse à 0,0005%	353 mμ	log *k* = 0,5

Conclusions

La grande similitude des spectres d'absorption des substances étudiées permet de conclure à une structure dihydro-indolique analogue à celle de l'adrénochrome.

C. Beaudet

Laboratoire des Recherches de la Société Belge de l'Azote et des Produits Chimiques du Marly, Renory-Ougrée, Belgique, le 23 septembre 1950.

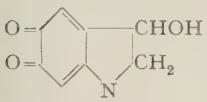
Summary

Some new derivatives of adrenochrome have been obtained, namely noradrenochrome, ethylnoradrenochrome, *N*-isopropylnoradrenochrome and epininochrome.

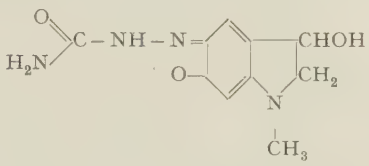
La monosemicarbazone de l'adrénochrome

L'un de nous[1] a montré récemment que l'activité hémostatique de la semicarbazone de l'adrénochrome ou adrenoxyl était sensiblement égale pour les variétés lévogyre, dextrogyre et racémique. Cette propriété physiologique n'est donc pas influencée par le signe du pouvoir rotatoire de l'adrénaline utilisée pour la synthèse de la semicarbazone envisagée.

Nous avons poursuivi l'étude physique de l'adrénochrome et de sa monosemicarbazone que nous représentons ci-après sous la forme d'ion dipolaire proposée pour le premier par J. Harley-Mason[2]:



I



II

1° *Solubilité.* L'adrénoxyl est insoluble dans les hydrocarbures, dans les éthers-oxydes (éther ordinaire, dioxane) et dans le chloroforme. Par ailleurs, il se dissout facilement dans la pyridine (0,3% à 15°C), dans les alcools méthylique et éthylique, et dans la glycérine. La variation de la solubilité dans l'eau avec la température s'établit comme suit pour la variété 1+:

A 5°C: 0,310 mg/cm³,
à 10°C: 0,350 mg/cm³,
à 15°C: 0,365 mg/cm³,
à 20°C: 0,400 mg/cm³.

Ajoutons encore que l'adrénoxyl présente une tendance très accusée à rester en solution sursaturée et que l'équilibre n'est atteint généralement qu'après 12 à 15 heures.

Nous avons donné par ailleurs[3] les valeurs pour les trois variétés optiques d'adrénochrome.

L'impossibilité d'obtenir un dérivé disubstitué de l'adrénoxyl et son insolubilité dans les solvants non hydroxylés nous incitent à lui attribuer la structure II ci-dessus.

2° *Etude spectrale.* Les mesures ont été effectuées avec le spectrophotomètre de Beckman, modèle D. U. Les courbes correspondent à des solutions aqueuses aux concentrations suivantes:

Adrénochrome 0,001%,
Adrénoxyl 0,0005%.

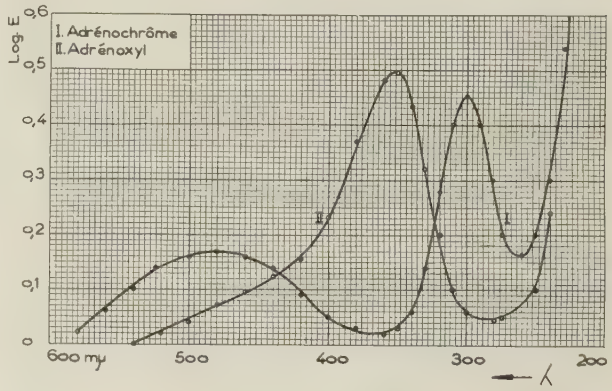
Position des maxima d'absorption:

Adrénochrome 3,000 Å et 4,820 Å,
Adrénoxyl 3,530 Å.

La position de ces bandes n'est pas modifiée si l'on remplace l'eau comme solvant par de l'alcool méthylique.

[1] C. Beaudet, P. Trabert et F. Henaux, Arch. Int. Physiol. *57*, 343 (1950).
[2] J. Harley-Mason, Exper. *4*, 307 (1948).
[3] C. Beaudet, Exper. *6*, 186 (1950).

3° *Etude polarimétrique.* Les mesures du pouvoir rotatoire ont été effectuées à l'aide d'un appareil équipé spécialement pour être très sensible et très lumineux, car les solutions concentrées d'Adrénoxyl sont très absorbantes et ne donnent que des angles de polarisation rotatoire faibles.



Notre installation était dotée d'une source lumineuse à grand éclat: lampe à vapeur de mercure Philips SP 500 à refroidissement à eau, et d'un monochromateur permettant de séparer les différentes raies du mercure; en outre, l'analyseur permettait de faire des mesures à une minute près lorsque l'absorption du faisceau lumineux n'était pas trop intense. Les résultats obtenus à l'aide d'une cellule de 115 mm pour la raie jaune du mercure ont été les suivants:

a) Adrénoxyl obtenu à partir d'adrénaline 1:

Solvant	Concentration en g/100 cm³	α	$[\alpha]^{15°}_{5,790}$
Méthanol . . .	0,15	+14′	+135°
Pyridine . . .	0,15	+37′	+352°

b) Adrénoxyl obtenu à partir d'adrénaline d:

Solvant	Concentration	α	$[\alpha]^{15°}_{5,790}$
Méthanol . . .	0,15	−14′	−135°
Pyridine . . .	0,15	−46′	−396°
Pyridine . . .	0,215	−57′	−394°

Nous constatons donc que l'oxydation de l'adrénaline par l'oxyde d'argent ne donne pas lieu à une synthèse asymétrique, que l'adrénochrome préparé à partir d'adrénaline optiquement active, soit lévogyre, soit dextrogyre, possède effectivement un atome de carbone asymétrique, et que l'oxydation provoque une inversion du sens de rotation de la lumière polarisée:

Adrénaline 1− → Adrénoxyl 1+,
Adrénaline d+ → Adrénoxyl d−.

Nous étudierons ultérieurement l'influence de la nature du solvant sur le pouvoir rotatoire spécifique.

4° *Etude radiocristallographique.* Les variétés lévogyre et dextrogyre se présentent sous deux formes cristallines

bien distinctes. L'une est caractérisée par un faciès en aiguille, l'autre par un faciès en paillette. Ces deux variétés se forment quasi simultanément au cours du refroidissement lent d'une solution aqueuse saturée. On passe très facilement d'une variété à l'autre par redissolution et recristallisation. A ce stade actuel de la recherche, nous n'avons pas encore pu déterminer les conditions précises de la transformation d'une variété dans l'autre; nous ignorons donc quelle est à l'état solide la forme stable.

La variété racémique fera l'objet d'une étude ultérieure.

Première forme: faciès en aiguille. Ces cristaux appartiennent au système orthorhombique. Ils sont allongés suivant l'axe *c* et généralement limités par les faces (110) et (010). Ils présentent d'autres part un dichroïsme très marqué.

Les cristaux sont rouges ou jaunes suivant que la direction de vibration de la lumière incidente est perpendiculaire ou parallèle à l'axe d'allongement, c'est-à-dire l'axe *c*. L'examen radiocristallographique des monocristaux nous à conduit aux valeurs suivantes pour les dimensions de la maille élémentaire:

$$a = 7{,}51 \text{ Å} \pm 0{,}02 \text{ Å},$$
$$b = 20{,}62 \text{ Å} \pm 0{,}03 \text{ Å},$$
$$c = 6{,}88 \text{ Å} \pm 0{,}02 \text{ Å}.$$

Les rapports des paramètres sont donc $a:b:c = 0{,}364:1:0{,}334$. En admettant quatre molécules dans la maille-unité, la densité calculée est 1,465.

Les extinctions systématiques s'observent pour $h00$ lorsque h est impair, pour $0k0$ lorsque k est impair, pour $c01$ lorsque 1 est impair. Le groupe de recouvrement est ainsi déterminé sans ambiguïté; c'est $P2_12_12_1$, et l'élément asymétrique est donc constitué par *une* seule molécule d'adrénoxyl.

Deuxième forme: faciès en paillette. Ces cristaux également orthorhombiques sont aplatis suivant l'axe *b* et légèrement allongés suivant l'axe *a*. Une pareille lame (010) ne nous a pas montré de dichroïsme. Les caractéristiques réticulaires sont les suivantes:

$$a = 10{,}83 \text{ Å} \pm 0{,}04 \text{ Å},$$
$$b = 18{,}95 \text{ Å} \pm 0{,}05 \text{ Å},$$
$$c = 5{,}33 \text{ Å} \pm 0{,}05 \text{ Å}.$$

Les extinctions systématiques conduisent sans ambiguïté au groupe spatial $P2_12_12_1$. L'élément asymétrique est constitué par une seule molécule d'adrénoxyl.

Nous voyons donc que les variétés gauche et droite dans chacune des deux formes cristallines sont indiscernables par les méthodes radiocristallographiques. Seules des mesures de pouvoir rotatoire en solution permettent de faire cette discrimination.

C. Beaudet, F. Debot, H. Lambot et J. Toussaint

Société Belge de l'Azote des Produits Chimiques du Marly, Liège, et Laboratoire de Physique expérimentale et de Cristallographie, Université de Liège, le 8 novembre 1950.

Summary

The physical properties of adrenochrome-semicarbazone are described: Solubility in various solvents, spectral absorption between 0·2 and 0·6 microns, rotatory power.

The crystal structure has been investigated and the relative spacings for the unit cell have been calculated.

Über den Kontaktaustausch an Ionenaustauschern

Ionen können an Ionenaustauschprozessen[1] nicht teilnehmen, wenn sie infolge ihrer Größe in das Netzwerk des Ionenaustauschharzes nicht eindringen können[2]. Zwischen solchen großen Ionen und gleich geladenen Ionenaustauschern kann jedoch ein Austausch von Gegenionen stattfinden, zum Beispiel von Anionen zwischen quaternären Ammoniumkationen und Anionenaustauschern[3] oder Kationen zwischen Pektinatanionen und Kationenaustauschern[4]. Eine solche Neukombination von Ionen wird als *Kontaktaustausch*[5] bezeichnet. Ein Kontaktaustausch spielt sich auch zwischen den Partikeln des gleichen Ionenaustauschers oder zweier verschiedener Austauscher ab. Besonderes Interesse besitzt der Ionenaustausch zwischen verschiedenen Austauschern, wenn nach der Neuverteilung der Gegenionen die Austauscher leicht wieder zu trennen sind. Dazu müssen sie sich zum Beispiel in Korngröße oder Dichte unterscheiden wie etwa Austauschharz und Ton[6] oder grobkörniger und feinkörniger Austauscher[7].

Im folgenden wird die Anwendbarkeit des Kontaktaustausches für die *Regeneration von Ionenaustauschern* untersucht.

Tabelle I zeigt, daß Kationen- und auch Anionenaustauscher[8] durch Kontakt mit löslichen oder unlöslichen Polyelektrolyten regeneriert werden können.

Bei der Regenerierung mit Pektin wurde eine zweiprozentige Pektinlösung durch die Schicht des Kationenaustauschers perkoliert, und anschließend wurde mit warmem Wasser nachgewaschen. – Die Regeneration mit Ionenaustauschern wurde in einem Glasrohr von 2 m Länge und 0,6 cm Durchmesser ausgeführt. Der feinkörnige Austauscher wurde mit langsam fließendem Wasser von unten durch die Schicht des grobkörnigen Austauschharzes, das zu regenerieren war, geschlämmt. Zum Schluß wurde bei höherer Durchflußgeschwindigkeit des Wassers das feinkörnige Harz vollständig aus dem Glasrohr entfernt und getrennt aufgefangen. – Der Umfang der Regeneration wurde nach dem Kontaktaustausch durch Perkolation von HCl bzw. NaOH und anschließende Titration des Perkolates ermittelt.

Der Kontaktaustausch gestattet eine einfache *Regenerierung von Gemischtbettaustauschern*, da jeweils nur die Gegenionen am Austausch beteiligt sind. Gemischtbettaustauscher besitzen hervorragende Entionisierungseigenschaften[9]. Sie mußten jedoch bisher für die Re-

[1] Vgl. Zusammenfassungen: F. C. Nachod, *Ion Exchange* (New York 1949). – R. Kunin und R. J. Myers, *Ion Exchange Resins* (New York 1950). – H. Deuel und F. Hofstettler, Exper. *6*, 445 (1950).

[2] Siehe Literatur bei: H. Deuel, J. Solms und L. Anyas-Weisz, Helv. chim. acta *33*, 2171 (1950). – R. Kunin, Ind. Eng. Chem. *43*, 734 (1951).

[3] R. Kunin und F. X. McGarvey, Ind. Eng. Chem. *43*, 734 (1951).

[4] L. Anyas-Weisz, J. Solms und H. Deuel, Mittlg. Lebensmitt. Hyg. *42*, 91 (1951).

[5] H. Jenny und R. Overstreet, J. Phys. Chem. *43*, 1185 (1939); Soil Sci. *47*, 257 (1939).

[6] L. Wiklander, Ann. Roy. Agr. College Sweden *16*, 670 (1949).

[7] T. R. E. Kressman und J. A. Kitchener, Disc. Faraday Soc. *7*, 90 (1949).

[8] Wir danken Herrn Dipl.-Ing. F. Furrer von der Eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, für die freundliche Überlassung der Ionenaustauscher.

[9] C. W. Davies und G. H. Noncollas, Chem. Ind. *69*, 129 (1950).

Tabelle I
Regeneration von Kationen- und Anionenaustauschern durch Kontaktaustausch

Zu regenerierender Ionenaustauscher		Polyelektrolyt zur Regeneration		Umfang der Regeneration zur H- bzw. OH-Form %
Bezeichnung	Menge in mÄqu.	Bezeichnung	Menge in mÄqu.	
Amberlite *IRC*-50 (schwache Säure, Na-Form, grobkörnig)	9,75	Pektin (schwache Säure, H-Form, gelöst)	45,0	97,3
Dowex 50 (starke Säure, Na-Form, ⌀ 1 mm)	3,78	Amberlite *IR*-120 (starke Säure, H-Form, ⌀ 0,1 mm)	60,0	72,0
Wofatit *M* (schwache Base, Cl-Form, ⌀ 1 mm)	2,65	Amberlite *IRA*-400 (starke Base, OH-Form, ⌀ 0,1 mm)	36,0	86,0

generierung entmischt werden[1]. Dabei kann es zu einer Zerstörung der Körner durch die mechanische Beanspruchung kommen.

Die direkte Regenerierung des Gemischtbettes durch Kontaktaustausch kann nach verschiedenen Methoden erfolgen: 1. Regenerierung von Kationen- und Anionenaustauschern durch Kontaktaustausch nacheinander, 2. Regenerierung des Kationenaustauschers mit Mineralsäure und anschließend des Anionenaustauschers durch Kontaktaustausch mit einer hochmolekularen Base, 3. Regenerierung des Anionenaustauschers mit Natronlauge und anschließend des Kationenaustauschers durch Kontaktaustausch mit einer hochmolekularen Säure.

In Tabelle II finden sich Versuche über die Regenerierung von Gemischtbettaustauschern nach den Methoden 2 und 3.

Im Gemischtbett wurde zuerst der eine Austauscher durch Perkolation mit niedermolekularer Säure bzw. Base regeneriert, dann wurde mit Wasser gut nachgewaschen, und schließlich wurde der andere Austauscher, wie in Tabelle I, mit einer hochmolekularen Base bzw. Säure regeneriert.

Kürzlich wurde von ähnlichen Ergebnissen unter Verwendung von Lösungen quaternärer Ammoniumbasen[2] berichtet (in-place monobed regeneration). Die Wiedergewinnung des Regenerierungsmittels ist hier umständlich. Bei den mitgeteilten Versuchen sind feinkörnige Austauschharze zur Regenerierung verwendet worden. Doch sind die Austauscher noch nicht genügend aufeinander abgestimmt. Es könnten dazu Spezialharze mit feinerer Körnung und geringerer Dichte als die zu regenerierenden Austauscher entwickelt werden. Die Abtrennung des Regenerierharzes ist einfach, dabei ist kein Nachwaschen nötig, und es tritt kein Verlust des Regenerierungsmittels ein. Das zur Regenerierung verwendete Harz, ein möglichst stark dissoziierter Elektrolyt, muß im Überschuß gebraucht werden. Die Dauer der Regenerierung ist bei dieser Methode noch ziemlich lang.

Der Kontaktaustausch gestattet, die Gegenionen von löslichen und unlöslichen hochmolekularen Säuren, Basen und Ampholyten durch H^+, OH^- und beliebige andere Ionen zu ersetzen. Die Brauchbarkeit von Ampholytharzen wäre noch zu prüfen.

Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel der Arbeitsbeschaffungskredite des Bundes ermöglicht. Wir danken bestens für diese Unterstützung.

H. Deuel, L. Anyas-Weisz und J. Solms

Agrikulturchemisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, den 23. Mai 1951.

Summary

The contact ion exchange between ion exchange resins and other soluble or insoluble polyelectrolytes is studied. By this technique mixed-bed systems of cation and anion exchangers can be regenerated without separation of the resinous components.

[1] R. Kunin und R. J. Myers, *Ion Exchange Resins* (New York 1950); *Resinous Reporter 9*, Nr. 4, 18 (Rohm & Haas & Co., 1948); Anonym, Nature *165*, 794 (1950).

[2] R. Kunin und F. X. McGarvey, Ind. Eng. Chem. *43*, 734 (1951).

Tabelle II
Regeneration von Gemischtbettaustauschern durch Kontaktaustausch

Zu regenerierender Ionenaustauscher		Elektrolyt zur Regeneration		Umfang der Regeneration zur H- bzw. OH-Form %
Bezeichnung	Menge in mÄqu.	Bezeichnung	Menge in mÄqu.	
Dowex 2 (starke Base, Cl-Form, grobkörnig)	8,00	NaOH	40,0	100
Amberlite *IRC*-50 (schwache Säure, Na-Form, grobkörnig)	9,75	Pektin (schwache Säure, H-Form, gelöst)	45,0	87,5
Dowex 2 (starke Base, Cl-Form, ⌀ 0,3 mm)	8,00	NaOH	40,0	100
Amberlite *IRC*-50 (schwache Säure, Na-Form, ⌀ 0,3 mm)	9,75	Dowex 50 (starke Säure, H-Form, ⌀ 1 mm)	60,0	66,0
Dowex 50 (starke Säure, Na-Form, ⌀ 1 mm)	4,00	HCl	20,0	100
Wofatit *M* (schwache Base, Cl-Form, ⌀ 1 mm)	2,65	Amberlite *IRA*-400 (starke Base, OH-Form, ⌀ 0,1 mm)	20,0	86,0

Über die Farbstoffbindung durch monomolekulare Proteinschichten

Um die Farbstoffbindung durch monomolekulare Proteinschichten in der Langmuir-Wanne bestimmen zu können, war es notwendig, die Messung in 2 Stufen vorzunehmen. Dazu wurde die benutzte Langmuir-Wanne aus Spiegelglas, mit den Abmessungen $13 \times 49 \times 0{,}4$ cm[1], durch einen eingekitteten Glasstreifen *g* in 2 gleichgroße Räume bzw. Oberflächen geteilt. Dieser Glasstreifen ist gerade so hoch, daß er beim gefüllten Trog eben noch überspült wird; es genügt, ihm einen entsprechend schmal geschnittenen Streifen aus Gummituch aufzulegen, um eine wasserdichte Trennung der beiden Troghälften *A* und *B* zu erreichen. Für den Versuch wird *A* mit 0,85 NaCl angefüllt, das mit Azetat-Puffer (Michaelis) von mol/500 auf ein pH von 4,7 gebracht wurde; nach sorgfältiger Reinigung der Oberfläche wird in üblicher Weise mit der «Agla»-Mikropipette 35 γ Protein gespreizt (0,2% Isoamylalkohol zugemischt)[2]. Nun wird *B* (immer bei gesperrtem *g*) mit der ebenfalls gepufferten Farbstofflösung angefüllt und die Oberfläche gereinigt. Nach 10 Minuten wird der Gummistreifen bei *g* vorsichtig abgehoben und mit einem Glasstreifen der Proteinfilm langsam von *A* nach *B* verschoben. Nach 20 Minuten wird der Proteinfilm über *B* zwischen zwei Glasstreifen auf eine Fläche komprimiert (siehe Abb. 2*a*),

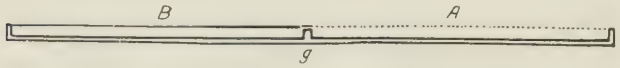
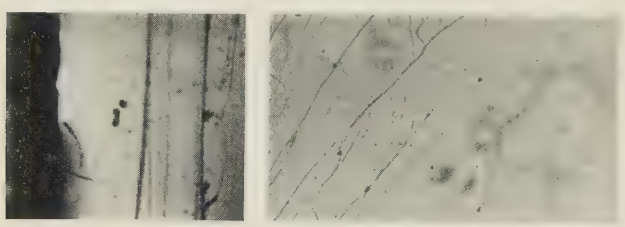


Abb. 1. In zwei gleiche Hälften unterteilte *Langmuir-Wanne*
g eingekitteter Glasstreifen ..... gespreiteter Film

die nur 1 cm breit und 13 cm lang (Trogbreite) ist. In diesem schmalen Zwischenraum wird unter stumpfem Winkel ein Glasstreifen von 1 cm Breite langsam über den Trogrand und unter den komprimierten Film geschoben; allmählich bewegt man den Glasstreifen quer über den Trog, so daß der gefärbte Film quantitativ von der Oberfläche abgehoben und in feinen Fäden auf dem Glasstreifen sichtbar wird (siehe Abb. 2*b*).



a Abb. 2. *b*

Rand des Glasstreifens — gestauchter Fibrinogenfilm, der mit Evans-Blue gefärbt ist. — Fibrinogenfilm, ungefärbt, auf Glasstreifen deponiert.

Vergrößerung: 120fach — Vergrößerung: 68fach

Am Glasstreifen noch haftende Flüssigkeit wird mit Filtrierpapier abgetupft und der kondensierte Film in 3 cm³ 0,1-*n*-NaOH gelöst. Dieses gefärbte Proteinsol verbringt man in die Quarzküvette des Beckman-Spektrophotometers Modell DU; dort wird die Absorption des Proteins auf Wellenlänge 282 mμ und diejenige des Farbstoffes auf der Wellenlänge seiner maximalen Absorption bestimmt. Die Gehalte werden aus Eichkurven entnommen; dabei hat sich als günstig erwiesen, jeweils 4 Proteinfilme von je 30 γ in denselben 3 cm³ 0,1-*n*-NaOH zu lösen und zur Messung zu bringen.

Der Berechnung wurde für Albumin ein Teilchengewicht von 69000 und für Fibrinogen ein solches von 400000[1] zugrunde gelegt. Aus der Reihenfolge der Farbstoffbindung geht hervor, daß dafür nicht sosehr die chemische Struktur des Farbstoffes (Zahl der Sulfogruppen usw.) für die Affinität verantwortlich ist als die Dispersion des Farbstoffsoles. So wird das grobdisperse Kongorot am stärksten gebunden, das feindisperse Evans-Blau nur mittelstark und das molekulardisperse Naphtholgelb überhaupt nicht meßbar. Die Farbstoffbindung ist somit in erster Linie kolloidchemisch bedingt. Wird das pH in *B* so verändert, daß eine Dispersionsabnahme des Farbstoffsoles eintritt, so sinkt auch die gebundene Farbstoffmenge, die sich für Evans-Blue bei den pH 7 – 4,7 – 2 wie 0,5 zu 1,2 zu 2 verhält. Als Vergleich sei angeführt, daß das ungespreitete Albumin bei pH 7 8–14 Moleküle Evans-Blue bindet (Rawson[2]) und bei pH 2 deren 70 (Le Veen und Fishman[3]).

Ch. Wunderly

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 18. März 1951.

Summary

An ordinary Langmuir-trough for the spreading of proteins is divided into two equal spheres by a glass barrier (see fig. 1). Protein mono-layers can easily be transfered from the surface where they are spread to the adjacent surface, where the binding of dyestuffs (Evans-blue, Trypan red, Trypan blue, Congo red, Naphthol yellow) takes place. The coloured protein mono-layer is brought into the condensed state (see figure 1*a*), deposited upon a glass slide (see figure 1*b*) and dissolved in 3 cm³ of 0·1-*n*-NaOH. Protein as well as dyestuff-

[1] Ch. Wunderly, Research *3*, 531 (1950).
[2] A. E. Alexander, *Surface Chemistry* (London, 1949), p. 123.
[1] J. L. Oncley, *Plasma Proteins* (Springfield, Ill., U.S.A., 1950), p. 8.
[2] R. A. Rawson, Amer. J. Physiol. *138*, 708 (1943).
[3] H. Le Veen und W. H. Fishman, Amer. J. Physiol. *151*, 26 (1947).

Farbstoff	Molekulargewicht	Messung auf Wellenlänge	121,8 γ Albumin binden		1 Molekül Albumin bindet Moleküle Farbstoff	117,6 γ Fibrinogen binden		1 Molekül Fibrinogen bindet Moleküle Farbstoff
			γ	Moleküle		γ	Moleküle	
		mμ		$\times 10^{15}$			$\times 10^{15}$	
Evans-Blue, Tolidinfarbstoff .	948	600	2,0	1,3	1,2	3,1	1,9	11
Trypanrot, Benzidinfarbstoff .	980	500	4,2	2,5	2,4	6,0	3,7	21
Trypanblau, Tolidinfarbstoff. .	948	590	6,7	4,2	4,0	8,4	5,3	30
Kongorot, Benzidinfarbstoff . .	656	490	5,5	5,0	4,7	7,4	6,7	38

content are evaluated in the Beckman spectrophotometer at their respectively maximal absorption. The transfer of the mono-layer makes it impossible that protein which is dissolved in the substrate during the process of spreading, is measured additionally. This constitutes the first appliance for separating the surface for spreading and the surface where reactions of the surface-chemical type take place. From the extent of binding of the different dyestuffs by serum albumin and fibrinogen, it can be deduced that their dispersion is the determining factor, so that it is a colloid-chemical reaction which governs the affinity between protein mono-layer and azodyestuff.

Model Experiments for the Production of Gastric Hydrochloric Acid

Recent experimental investigations concerning the secretion of hydrochloric acid by gastric mucosa, especially those of DAVIES *et al.*[1], have made important statements with respect to this process. Relations have been established between Q_{O_2}, Q_{CO_2} and Q_{HCl} respectively. The quantitative data of these investigations, however, characterize only the initial and final state and do not interpret the more detailed mechanism of this process.

Undoubtedly, the hydrolysis of the sodium chloride, or the liberation of hydrochloric acid by means of a weaker acid, can only take place at ordinary temperatures by means of substances which have specific affinity for certain ions. These substances must be—to put it perhaps more comprehensibly if not very precisely—permeable for certain ions and not for others. For the reaction concerned we believe that it is possible to find such a model in the ion exchange substances. Ion exchange resins were employed.

The production of hydrochloric acid from sodium chloride and a weak acid can be written as follows:

[1] R. E. DAVIES, Biochem. J. *42*, 609; *43*, 321, 336 (1948).

(1) Using cation exchange resin:—

(*a*) $R\cdot H + Na^+ + Cl^- = R\cdot Na + H^+ + Cl^-$.

The regeneration of the sodium resin by means of a weak acid, e. g. with succinic acid, proceeds:

(*b*) $R\cdot Na + H^+ + (\text{succinate})^-$
$= R\cdot H + Na^+ + (\text{succinate})^-$.

(2) Using anion exchange resin:

(*a*) $R\cdot Cl + H^+ + (\text{succinate})^-$
$= R\cdot\text{succinate} + H^+ + Cl^-$.

The resin succinate will be treated:

(*b*) $R\cdot\text{succinate} + Na^+ + Cl^-$
$= R\cdot Cl + Na^+ + (\text{succinate})^-$.

As the processes (*a*) and (*b*) can be carried out separately one after another, we can see that there is a possibility for the production of hydrochloric acid from sodium chloride by means of weak acids.

In our experiments the cation exchange resin was brought into the form $R\cdot H$, the anion exchange resin into $R\cdot Cl$ and washed until of neutral reaction. Then the solution containing the ion to be exchanged was poured into the column. In the case of cation exchange this was a sodium chloride solution; in the case of anion exchange it was succinic acid. The extent of the exchange was measured by titration of the hydrogen ions in the dropping down liquid. Indication was made either with methyl-orange, or by pH-measurements.

Our expectation was fulfilled in both cases. The cation exchange resin, treated with succinic acid, gave with sodium chloride solution hydrochloric acid; on the other hand, the anion exchange resin regenerated by sodium chloride brought a considerable amount of hydrochloric acid into the succinic acid solution.

After these experiments the regeneration of the cation exchange, as well as the treatment of the anion exchange resins by means of a still weaker acid, carbonic acid, was attempted. As the following tables show it was successful:

Table I

Anion exchange

Experiments with CO_2

Amberlite IR-4B transferred with HCl into $R\cdot Cl$, washed with distilled water until of neutral reaction:

	(0)	100 ml water saturated with CO_2	pH = 4·20
$R\cdot Cl$	(I)	10 × 10 ml water saturated with CO_2 until	pH = 3·52 consumed 12·2 ml 0·1 *n* NaOH
	(II)	5 × 10 ml water saturated with CO_2 until	pH = 3·50 consumed 4·5 ml 0·1 *n* NaOH
	(III)	5 × 10 ml water saturated with CO_2 until	pH = 3·78 consumed 3·9 ml 0·1 *n* NaOH
	Liberated HCl:		20·6 ml 0·1 *n* NaOH

Table II

Cation exchange

Amberlite IR-105 (commercial form) transferred with 30 × 10 ml water saturated with CO_2 into $R\cdot H$, washed with 5 × 10 ml distilled water until of neutral reaction:

$H\cdot R$	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	1·38 ml 0·1 *n* NaOH
	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	1·76 ml 0·1 *n* NaOH
	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	0·88 ml 0·1 *n* NaOH
	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	0·40 ml 0·1 *n* NaOH
	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	0·12 ml 0·1 *n* NaOH $R\cdot Na$
	Liberated HCl:	4·56 ml 0·1 *n* NaOH

Table III

The R-Na form of the resin is treated with 20×10 ml 0·1 n succinic acid, washed with 10×10 ml distilled water until of neutral reaction:

			Initial pH	
H·R	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	4·23 ml 0·1 n NaOH	1,54	
	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	6·63 ml 0·1 n NaOH	1,23	
	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	4·60 ml 0·1 n NaOH	1,30	
	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	2·20 ml 0·1 n NaOH	1·60	
	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	0·81 ml 0·1 n NaOH	2·00	
	10 ml 2% NaCl consumed (until 3·60 pH)	0·38 ml 0·1 n NaOH	2·45	R·Na
	Liberated HCl	20·82 ml 0·1 n NaOH		

The results of our experiments do not contradict those of Davies; our data even explain and complete them in detail. Thus they elucidate the remark of Davies concerning the process of HCO_3^- formation $-OH^- + CO_2 = HCO_3^-$. We believe that this picture can help to throw light on some observations of Davenport[1] which could not be brought into agreement with his general considerations, e. g. the absence of the effect on the acid production of some substances inhibiting the action of carboanhydrase. If the steps of the whole process are separated, as they must be separated, then these contradictions do not exist any more.

The question might still arise whether our model could be applied to gastric secretion. The literature referring to the ion exchange substances does not mention until 1949 that substances of similar function occur in human organs. This, however, does not seem improbable. The anion exchange resins are amines of high molecular weight and it is probable that other amino groups can also exert similar functions. In our laboratory experiments are in progress for the study of ion exchange functions of some proteins. According to the data hitherto available, these processes – corresponding to the manifold functions of the proteins – are very complex and the observed exchanges must be proved in long series of experiments.

We believe that the permeabilities in the organ can only be observed if a peculiar affinity exists between the transferring and the transferred substances when the permeability can be reduced to a continuous ion exchange.

Zoltán G. Szabó, Sándor Orsós, and László Csányi

Department of Chemistry University of Szeged, Hungary, March 1, 1951.

Zusammenfassung

Da einerseits Kationaustauschharze, die mit schwachen Säuren in die Form $H \cdot R$ übergeführt worden waren, mit Kochsalzlösung Salzsäure ergaben; und andererseits Anionaustauschharze, die mit Kochsalzlösung behandelt worden waren ($R \cdot Cl$), Salzsäure in den Zustand einer Lösung einer schwachen Säure überführten, so glauben die Autoren, daß der Ionenaustausch an Harzen als Modell für die Magensäuresekretion gelten könne. Die Permeabilitäten können auch als fortwährende Ionenaustauschvorgänge beteiligt sein.

[1] H. W. Davenport, Physiol. Rev. *26*, 560 (1946).

Possible Immature Forms of Bacteriophage

Though it has not been hard to obtain electron micrographs showing bacteria in many stages of the lysis they undergo when attacked by bacteriophage, these photographs have contained surprisingly little unequivocal evidence as to how new bacteriophage particles are produced during this process. In the usual preparations[1] new particles are commonly seen in clumps and strings distributed through the remains of a bacterium; and often these groups, especially in the case of such tailless bacteriophages as T_3 or T_7 against *Escherichia coli*, have had the appearance of microcolonies[2]. Nevertheless, they have not contained particles which could be recognized as being in course of division. This has stimulated a continuing search for objects that may be incompletely formed, or immature, particles of bacteriophage. A year ago Herčík[3] and the writer[4] independently found segmented filaments having the diameter of bacteriophage heads in certain lysates of *Escherichia coli*; but the conditions under which these have appeared suggest that they are not steps in the usual process of bacteriophage proliferation. This note describes other objects in cultures of *Escherichia coli* infected with T_2 and T_4 bacteriophages which are connected with the lytic process and may be forms of bacteriophage in course of development.

Fig. 1. – The protoplasmic remains of a bacterium lysed by T_2 bacteriophage. Distributed throughout it are some granules and many "holes" with the short "tails" referred to in the text. Magnification = 38,000 ×.

Many "holes" having the diameter of bacteriophage heads (fig. 1) have already[1] been seen in lysed bacteria. At first these were thought to be protoplasmic sites from

[1] R. W. G. Wyckoff, Biochim. et biophys. acta *2*, 27, 246 (1948).
[2] R. W. G. Wyckoff, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *71*, 144 (1949).
[3] F. Herčík, Exper. *6*, 64 (1950).
[4] R. W. G. Wyckoff, Exper. *6*, 66 (1950).

which bacteriophage particles had escaped; but careful study reveals detail incompatible with this interpretation. They show a gradation to forms like mature particles and HERČÍK[1] has suggested that they are indeed partially developed particles. A common feature of the "holes" are granules, a rim and a short thick "tail". The "tails" are uniform in diameter and much shorter, though possibly somewhat thicker, than the tails of mature particles. Objects of the same size and shape as these short "tails" also occur both around the periphery and within the protoplasmic remains of lysing bacteria. They are found both singly and in the characteristic associations shown in figure 2. Here some of them are ranged radially about a central flat mass like the spokes about the hub of a wheel. Sometimes these "wheels" are practically complete; more often the short "tails" only partly surround the central body, which is flatter and of a somewhat greater diameter than a mature bacteriophage head. At their outer ends some but not all the "tails" seem attached to other flattened heads that have the same diameter and otherwise resemble the "holes" of figure 1. In other fields particles are seen which have heads substantially like those of normal bacteriophage and the short tails discussed here. It is perhaps significant that lysis under the unfavorable conditions that produce filaments having the diameter of heads, also gives rise to numerous long filaments having about the diameter of these "tails".

Fig. 2. – A bacterial residue showing a few "holes" and many "tails". An especially well-developed "wheel" is seen at the bottom center of the mass. Magnification 36,000 ×.

The "wheels" are frequently seen in preparations made by pouring suitably incubated broth cultures onto agar plates, draining, allowing the broth to soak into the agar and "replicating" the surface that results. It is necessary to entertain the possibility that the "wheels" are artifacts developed during surface drying. Against this is the uniformity in diameter of their "hubs" and their occurence both within and without the bacterial residues. If they are not such artifacts, they represent an important phase in bacteriophage development. This implies for the tail of the even-numbered bacteriophages an unexpected rôle in the process of multiplication. There has already been considerable evidence that the several types of bacteriophage may not proliferate in the same fashion; evidently the tailless strains cannot show the forms just described.

The existence of immature and developing forms would be compatible with many other results bearing on the multiplication of these viruslike agents. In particular it suggests a possible reason why infecting bacteriophage particles cannot be recovered[1] from a diseased bacterium during the first few minutes after their adsorption. It would also make more understandable the very rapid increase in demonstrable bacteriophage that occurs towards the end of the burst period; this increase would then be influenced by the rates of both maturation and multiplication of the developing bacteriophage.

Because of their obvious bearing on attempts to understand the mechanism of the proliferation of bacteriophage, we are continuing to investigate these and other "immature" forms and the conditions under which they appear.

RALPH W. G. WYCKOFF

Laboratory of Physical Biology, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Md., March 10, 1951.

Zusammenfassung

Wird *Escherichia coli* mit T_2- oder T_4-Bakteriophagen infiziert, so findet man innerhalb und außerhalb der Bakterien kurze Stäbchen mit oder ohne Kopf. Diese sind oft radähnlich angeordnet und können als Entwicklungsstadien der Phagen angesehen werden.

[1] F. HERČÍK, Czech. Med. J. *89*, 91 (1950).

[1] A. H. DOERMANN, Carnegie Institution Washington, Yearbook *47*, 176 (1947–1948).

Über die chemische Natur der Induktionsstoffe im Implantatversuch bei *Triton*

Nachdem TOIVONEN und CHUANG[1] gezeigt hatten, daß es mindestens zwei verschiedene Induktionsstoffe gibt, war die nächste Aufgabe, die chemische Natur dieser Stoffe näher zu charakterisieren. Schon die Versuche dieser Autoren machten es wahrscheinlich, daß das spinokaudale Agens ein Protein sei (Kochexperimente[2]). Eine weitere Stütze brachten die Untersuchungen von TOIVONEN und KUUSI[3], in welchen die spinale Induktionswirkung durch proteolytische Enzyme vernichtet wurde. Auf der anderen Seite ist nach BRACHET[4] die Bedeutung der Nukleinsäuren für die Induktion sehr wichtig. Auch LEHMANN[5] hat die Meinung geäußert, daß das spinale Agens ein Protein, das archenzephale eine Nukleinsäure sei. In diesen Arbeiten wurde versucht, in diese Probleme mehr Klarheit zu bringen.

Als Testmaterial dienten *Triton taeniatus* und *Triton palmatus*. Die Implantationsmethode wurde angewandt, die Weiterzüchtung der Tiere dauerte zwei Wochen lang. Als Ausgangsmaterial für die Fraktionierungen habe ich die zwei von TOIVONEN als regionalspezifisch gefundenen Gewebe verwendet: Meerschweinchenleber als archenzephalen Induktor, Meerschweinchenniere als spinokaudalen Induktor. Über die Resultate dieser Experimente kann ich folgendes berichten:

[1] S. TOIVONEN, Ann. Acad. Sci. Fenn. [A] *55*, 6 (1940). – H.-H. CHUANG, Roux'Arch. *139*, 556 (1939).

[2] H.-H. CHUANG, Roux'Arch. *139*, 556 (1939); *140*, 25 (1940). – S. TOIVONEN, Rev. suisse Zool. *57*, 41 (1950).

[3] S. TOIVONEN und T. KUUSI, Ann. Zool. Soc. zool.-bot. Fenn. Vanamo *13*, 3 (1948).

[4] J. BRACHET, *Embryologie chimique* (Masson, Paris 1944).

[5] F. E. LEHMANN, *Einführung in die physiologische Embryologie* (Birkhäuser, Basel 1945).

1. Isolierung der Zellkerne. In diesen Fraktionen sind nur archen- und deuterenzephale Induktionsstoffe anwesend, nicht dagegen spinale. Die Kerne vom Leber- und Nierengewebe geben gleichartige Resultate.

2. Die Thymonukleoproteide (nach Mirsky und Pollister[1] isoliert) aus Leber und Niere geben nur archenzephale Induktionen und sind als Induktoren ziemlich schwach (Leber 2 Induktionen von 28 Fällen, Niere 6 von 29). – Die Plasmaproteine (aus Leber und Niere mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert und mit Alkohol oder Trichloressigsäure gefällt) geben archen- und deuterenzephale, aber keine spinalen Induktionen. Die Leberfraktionen haben eine größere archenzephale, die Nierenfraktionen eine größere deuterenzephale Tendenz.

3. Die Granulenfraktionen, die mittels der fraktionierenden Zentrifugationsmethode präpariert wurden (folgende Fraktionen: 1. große Granulen, 2. mittlere und kleine Granulen, 3. lösliche Fraktion und 4. Geweberest), haben nach Herkunft verschiedenartige Resultate ergeben. Die Richtlinien sind, daß die Leber einen löslichen archenzephalen Stoff enthält (lösliche Fraktion aus Leber gab in 12 Fällen von 22 gültigen ausschließlich archenzephale Induktionen). Den vollen Gegensatz bildet das Nierengewebe, das von Granulen befreit ist und eine ausgesprochene deuterenzephal-spinokaudale Tendenz zeigt (Geweberest aus Niere gab von 16 gültigen Fällen in 14 deuterenzephale, in 15 spinokaudale und in einem Fall unsichere archenzephale Induktionen). Jedoch ist aus dem Nierengewebe auch ein Teil des spinalen Stoffes in Lösung gegangen, denn die lösliche Fraktion gibt unter anderem spinale Induktionen (12 Fälle von 31 gültigen). Alle Nierenfraktionen enthalten deuterenzephal-spinokaudale Stoffe; die stärkste archenzephale Wirkung findet man hier in der löslichen Fraktion (in 8 Fällen von 31 gültigen). Umgekehrt ist in allen Leberfraktionen die archenzephale Wirkung zugegen; die stärkste spinale Wirkung findet man in der Fraktion der kleinen Granulen (von 18 gültigen Fällen fand man in 3 spinale, in 13 deuterenzephale und in 4 archenzephale Gebilde).

4. Nach Ribonukleasebehandlung (vgl. Brachet[2]) des Nierengewebes bei 37° C bleibt die deuterenzephal-spinokaudale Wirkung unverändert erhalten (22 gültige Fälle waren alle positiv, von diesen zeigten 16 spinale, 20 deuterenzephale und 6 archenzephale Induktionsgebilde; die Kontrolle in destilliertem Wasser gab ebenfalls in allen gültigen Fällen Induktionen, von 21 Fällen enthielten 11 spinale, 15 deuterenzephale und 8 archenzephale Gebilde). Was den archenzephalen Stoff betrifft, sind die Versuche zu unvollständig (sowohl das mit Ribonuklease behandelte Lebergewebe als auch die Kontrollen zeigten nur schwache Induktionswirkungen), um über dessen Natur, ob Ribonukleinsäure oder nicht, Schlüsse zu erlauben.

5. Formol, sowohl starkes als schwaches (das unter anderem die Aminogruppen der Proteine blockiert), schaltet die spinale Induktionswirkung vollständig aus. Die archenzephalen Induktionen sind vielleicht geschwächt, aber nicht verschwunden, die deuterenzephalen beinahe verschwunden. Es ist interessant, zu bemerken, daß nach Lallier[3] die Behandlung mit Formol die Induktionswirkung des normalen Organisators fast ganz vernichtet. – Diese Versuche liefern eine weitere Stütze für die Auffassung, daß der spinale Induktor ein Protein sei.

Taina Kuusi

Zoologisches Laboratorium der Universität Helsinki und Laboratoire de morphologie animale, Faculté des sciences de l'Université libre de Bruxelles, den 15. Oktober 1950.

Résumé

Des expériences d'implantation au moyen d'inducteurs hétérogènes (fractions de foie et de rein de cobaye) ont montré que les noyaux, des nucléoprotéides et des protéines plasmatiques donnent des inductions archencéphaliques et deuterencéphaliques. Les fractions des granules et le «surnageant» donnent surtout des inductions archencéphaliques-deuterencéphaliques, tandis que les débris cellulaires de rein, après l'élimination des granules, représentent un inducteur spinal spécifique. Le «surnageant» de rein donne également, en partie, des inductions spinales. La ribonucléase à 37° C n'attaque pas le pouvoir inducteur spinal. Les tissus traités avec le formol ne donnent plus d'inductions spinales, tandis que les inductions archencéphaliques sont maintenues.

[1] A. E. Mirsky und A. W. Pollister, Proc. Nat. Acad. Sci. *28*, 344 (1942).

[2] J. Brachet, Acta biol. Belg. *2*, 16 (1942).

[3] R. Lallier, Exper. *6*, 92 (1950).

Über die Anlage des Telencephalons in der Neurula der Amphibien und die Faktoren seiner bilateralen Ausbildung

Über die Entwicklungsleistung des Querwulstes der Neurula sind die Ansichten der Forscher noch geteilt. So sprechen Woerdeman[1] und Fautrez[2] dem Querwulst eine Mitwirkung bei der Gehirnbildung ab, während Hörstadius und Sellman[3] hervorheben, daß nach Vitalmarkierungsversuchen die Hautnaht etwa mit der Mittellinie des Neuralwulstes zusammenfalle.

Nun habe ich vor kurzem[4] die Ergebnisse von Umdrehungsversuchen an Neuralplattenabschnitten, die einige Tatsachen über die Riechgrubeninduktion beibringen, mitgeteilt. Im folgenden seien diejenigen Experimentalbefunde zusammengefaßt, die die Anlage des Telencephalons und die Faktoren seiner bilateralen Ausbildung betreffen. Aus unseren Umdrehungsexperimenten, die im folgenden dargestellt werden, hat sich ergeben: wenn der Querwulst in das umgedrehte Stück mit inbegriffen wurde, so fehlte stets das Telencephalon; wurde der Schnitt hingegen derartig ausgeführt, daß er genau an der Grenze zwischen Querwulst und Medullarplatte verlief, wurde stets das Telencephalon gebildet. Und zwar:

1. Wurde einer jungen Neurula von *Triton taeniatus* oder *Axolotl* mit gut angedeuteten Neuralwülsten die vorderen rechten drei Viertel der Neuralplatte ohne Unterlagerung, aber mit dem ganzen angrenzenden Neuralwulst umgedreht, so wie in der Abbildung 1*a* ersichtlich ist, so entwickelt sich die ganze rechte Gehirnhälfte, vom Telencephalon bis zur Medulla, in umgekehrter Lage. So findet man vorn, neben dem linken, genau zur Hälfte entwickelten Telencephalon, eine halbe Medulla.

2. Dreht man einen Streifen Medullarplatte um, ohne Unterlagerung, aber mit nur einem kleinen Anteil des Querwulstes, so wie im beigefügten Schema ersichtlich

[1] M. W. Woerdeman, Roux' Arch. *116*, 220 (1929).

[2] J. Fautrez, Bull. Acad. Belg. sci. *28*, 391 (1942).

[3] S. Hörstadius und S. Sellman, Nova acta Reg. Soc. sci. Upsaliensis [IV] *13*, 1 (1946).

[4] L. Raunich, Exper. *6*, 337 (1950).

ist (Abb. 1*b*), so fehlt stets in den operierten Larven das rechte Telencephalon (Abb. 2).

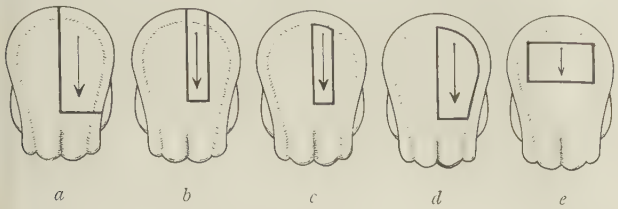


Abb. 1. Schema der verschiedenen Operationen (Erklärung im Text).

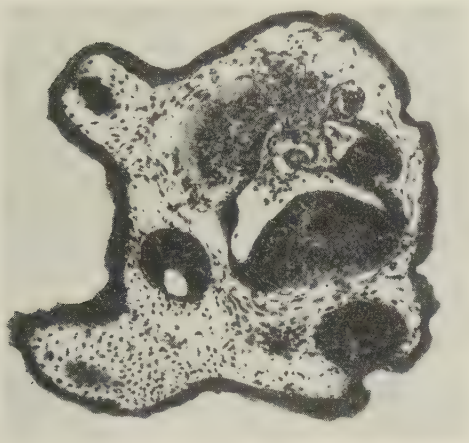


Abb. 2. Axolotllarve, nach 1*b* operiert: Querschnitt durch die vordere Kopfgegend. Auf der linken Seite (rechts in der Abbildung) ist das linke halbe Gehirn sichtbar; auf der rechten Seite eine halbe Medulla (120 ×).

3. Mit demselben Operationstypus, aber ohne Querwulst (Abb. 1*c*) hingegen entwickelt sich regelmäßig das rechte Telencephalon (Abb. 3), das heißt, der umgedrehte Gehirnabschnitt beginnt erst auf der Höhe des Diencephalons. Dasselbe Ergebnis erhält man, wenn man den ganzen rechten Medullarplattenabschnitt ohne Wulst umdreht (Abb. 1*d*).

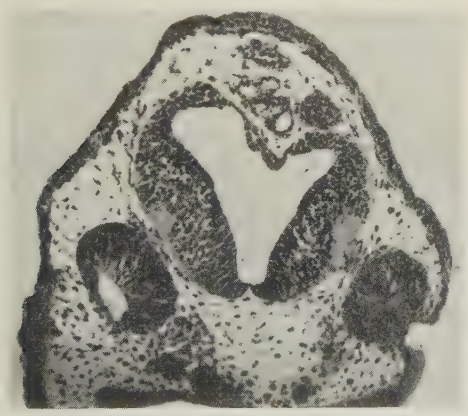


Abb. 3. Axolotllarve, nach 1*c* operiert; Querschnitt durch die vordere Kopfgegend. Telencephalon normal ausgebildet, das rechte (das operierte) leicht hypertrophisch (links in der Abbildung) (120 ×).

Es ist noch hervorzuheben, daß bei einigen operierten Keimen nach 1*c* das rechte Telencephalon kleiner als das linke ausgebildet war; bei diesen Versuchen war aber stets, laut Operationsprotokoll, ein kleiner Streifen des Querwulstes im umgedrehten Stück enthalten.

Aus diesen Tatsachen ergibt sich: bei unberührtem Querwulst bildet sich das Telencephalon normal aus; kleinen Defekten am Querwulst entsprechen minder ausgebildete Telencephala; bei Abwesenheit des Querwulstes fehlt das Telencephalon. Diese Tatsachen können nicht anders gedeutet werden, als daß man in dem Querwulst die Anlage des Telencephalons annimmt. Somit würden sich also im Querwulst medial die Telencephalonanlage und lateral diejenige der Epiphyse[1] befinden. Es bestätigt sich somit die Angabe von Hörstadius und Sellman[2], daß der Querwulst Nervengewebe liefert.

Was die Bilateralität der kranialen Kopfgebilde (Augen, Riechgruben, Telencephalon) anbelangt, so wird im allgemeinen angenommen, daß diese von der Unterlage aus, und zwar von der prächordalen Platte, bedingt werde. Wohlbekannte experimentelle Tatsachen haben bewiesen, daß Störungen in der Unterlagerung Störungen in der Ausbildung der Kopforgane hervorrufen[3]. Andererseits haben Hörstadius und Sellman[2] beobachtet, daß das Gehirn die Formbildung des Kopfskelettes beeinflußt, daß also Wechselbeziehungen zwischen Neuralanlage und Unterlage vorkommen müssen.

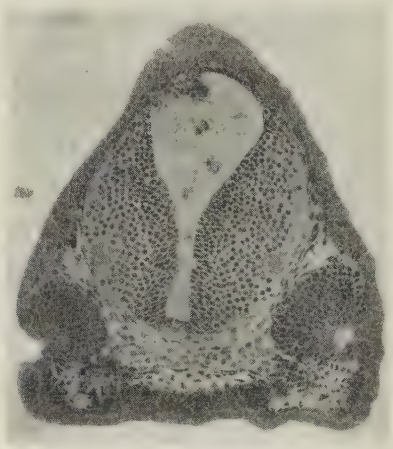


Abb. 4. Schnitt durch die vordere Kopfgegend einer Axolotllarve, nach 1*e* operiert; das Telencephalon ist einzeln ausgebildet; Riechorgane doppelt und normal (120 ×).

In meinen Umdrehungsversuchen an der Medullarplatte habe ich auch die bekannten Versuche Spemanns[4] (Umkehrung eines rechteckigen Stückes der Medullarplatte, Abbildung 1*e*), aber ohne Unterlage, wieder ausgeführt und habe nun beobachtet, daß alle so operierten Keime das Telencephalon unpaarig ausgebildet hatten. Alle übrigen paarigen Kopforgane (Riechplakoden, Augen) waren normal (Abb. 4). Da in diesen Fällen das Urdarmdach sorgfältig geschont wurde, wie in den Protokollen besonders hervorgehoben ist, so muß man annehmen, daß die Bilateralität des Telencephalons auch von den etwas dahinter gelegenen Abschnitten der Medullarplatte bedingt werde. Es dürfte sich lohnen, diese Annahme eingehender zu untersuchen.

L. Raunich

Institut für vergleichende Anatomie, Universität Bologna, den 30. April 1951.

[1] J. C. Van de Kamer, *Over de Ontwikkeling de Determinatie en de Betekenis van de Epiphyse en de Paraphyse van de Amphibien*, Inauguraldissertation (Van der Wiel, Utrecht 1949).

[2] S. Hörstadius und S. Sellman, l. c.

[3] Eine vorzügliche und erschöpfende Behandlung der Bibliographie findet man in F. E. Lehmann, *Einführung in die physiologische Embryologie* (Birkhäuser, Basel 1945).

[4] H. Spemann, Zool. Jb. *15*, Suppl. *1* (1912).

Riassunto

In base a esperimenti di rotazione di segmenti vari di piastra midollare l'autore ha dimostrato che l'abbozzo del telencefalo nella piastra midollare è situato nel cercine trasverso, e che la bilateralità del telencefalo è condizionata anche dai territori caudalmente adiacenti della piastra midollare.

Lokalisatorischer Nachweis von Thermorezeptoren bei *Dorcus parallelepipedus* L. und *Pyrrhocoris apterus* L.

Zur Feststellung der thermischen Empfindlichkeit verschiedener Körperstellen bedient man sich entweder der «Abtastmethode» (Doflein[1]), oder man beobachtet das Verhalten der Tiere in einem Temperaturgefälle, indem man mit Hilfe einer «Temperaturorgel» (Herter) die «Vorzugstemperatur» (Bodenheimer) (= «Temperaturoptimum», Herter) und die «Schrecktemperatur» (Herter) bestimmt. Erhöhen sich diese Werte nach gewissen Amputationen, so kann man folgern, daß bei diesen «Defekttieren» die thermische Empfindlichkeit geringer ist, also auf den amputierten Gliedern Thermorezeptoren liegen müssen.

Mit beiden Methoden konnte Herter[2] zeigen, daß bei den Feuerwanzen besonders die Antennen temperaturempfindlich sind. Eine Amputation einzelner Antennenglieder wurde jedoch nicht durchgeführt.

Bei der Ritterwanze (*Lygaeus equestris* L.) entfernte Herter dagegen auch allein das Antennenendglied. Aus der Beobachtung, daß der Prozentsatz der im heißen Gebiet umgekommenen Tiere nach der Amputation zunahm, schloß er, «daß schon die letzten Glieder allein bei der Perzeption thermischer Reize eine Rolle spielen». Eine Erhöhung der «Schrecktemperatur» war allerdings *nicht* nachzuweisen.

Für die Käfer scheint dagegen eine nähere Lagebestimmung des Temperatursinnes noch vollkommen zu fehlen.

Es wurden deshalb Versuche gemacht, die Lage der Thermorezeptoren bei einer Käferart, dem Zwerghirschkäfer (*Dorcus parallelepipedus* L.), genauer festzustellen. Ferner wurde durch Teilamputationen der Antennen die thermische Empfindlichkeit der einzelnen Antennenglieder bei der Feuerwanze (*Pyrrhocoris apterus* L.) bestimmt.

Als Untersuchungsmethode wählte ich die der «Schrecktemperaturerhöhung».

Gemessen wurde die «Schrecktemperatur» zunächst mit der von Herter[3] konstruierten «verbesserten Temperaturorgel». Es stellte sich jedoch heraus, daß der im Bereich der Schrecktemperatur vorhandene große Gegensatz zwischen der Boden- und der Lufttemperatur ein großes Maß von Ungenauigkeit in die Messungen hineinbringt. Aus diesem Grunde wurde eine Umkonstruktion vorgenommen.

Als Grundlage diente die Hertersche Temperaturorgel, eine Eisenschiene von $60 \times 10 \times 1{,}5$ cm. Auf diese wurde ein aus 4 mm dicken Hartfaserplatten bestehender Rahmen von $50 \times 9{,}8 \times 3$ cm gesetzt, in dem 5 mm oberhalb der Eisenschiene ein engmaschiger Eisendraht als Boden eingelegt ist. Den oberen Abschluß des Apparates bildet eine Glasplatte. Die Thermometer stecken im Abstande von 7,5 cm in seitlichen Ausbohrungen, und zwar so, daß sie dicht oberhalb des Drahtbodens zu liegen kommen. Sie zeigen also die Temperatur der das Tier umgebenden *Luft* an.

Durch diese Konstruktion wird der Gegensatz zwischen der Boden- und der Lufttemperatur stark vermindert, so daß das ganze Tier ungefähr gleichen Temperaturverhältnissen ausgesetzt ist. Die Vorteile dieser «Lufttemperaturorgel» kommen in einer geringeren Streuung der Meßergebnisse deutlich zum Ausdruck.

Die im folgenden angegebenen Mittelwerte wurden im allgemeinen aus 100 Einzelmessungen gewonnen und sind statistisch gesichert[1].

Versuchsergebnisse:

Tabelle I

«Schreckreaktion» von *Dorcus parallelepipedus* L. auf Temperaturreize

Amputationsgrad	Schreck-temperatur	Folgerung
a) intakte Tiere	41,11 ∓ 0,17°C	Die Maxillarpalpen tragen Thermorezeptoren. Von den Antennen sind besonders die 3 distalen Glieder temperaturempfindlich.
b) ohne Antennen	41,88 ∓ 0,20°C	
c) ohne Antennen und ohne Maxillarpalpen	45,61 ∓ 0,18°C	
d) ohne Maxillarpalpen, mit Antennen	42,79 ∓ 0,18°C	
e) ohne Maxillarpalpen u. ohne die 3 distalen Antennenglieder	45,73 °C	

Tabelle II

«Schreckreaktion» von *Pyrrhocoris apterus* L. auf Temperaturreize

Amputationsgrad	Schreckreaktion	Folgerung
f) intakte Tiere	45,22 ∓ 0,15°C	Die wichtigsten Thermorezeptoren liegen auf den Antennenendgliedern. Die Temperaturempfindlichkeit ist abhängig von der Anzahl der Rezeptoren.
g) ohne Antennenendglieder	49,03 ∓ 0,18°C	
h) ohne die 2 distalen Glieder	49,09 ∓ 0,18°C	
i) ohne die 3 distalen Glieder	50,07 ∓ 0,17°C	
k) ohne Antennen	50 – 53 °C	
l) intakte Tiere	46,89 ∓ 0,20°C	
m) ohne 1 Endglied	48,51 ∓ 0,18°C	
n) ohne 2 Endglieder	49,60 ∓ 0,20°C	

1. Bei *Dorcus parallelepipedus* L. liegen die wichtigsten Thermorezeptoren auf den Maxillarpalpen und den drei distalen Antennengliedern, da die «Schrecktemperatur» nach entsprechenden Amputationen um 4 bzw. 3°C ansteigt (vgl. *b–c* bzw. *d–e*).

2. Den Maxillarpalpen kommt wahrscheinlich eine größere thermische Empfindlichkeit zu als den Antennen (vgl. *a–b* und *a–d*).

3. Bei *Pyrrhocoris apterus* L. liegen die Temperatur rezeptoren hauptsächlich auf den Antennenendgliedern, da nach ihrer Amputation eine Erhöhung der «Schrecktemperatur» um 3 bis 4° eintritt (vgl. *f–g* und *l–n*).

[1] F. Doflein, *Der Ameisenlöwe* (Verlag G. Fischer, Jena 1916).
[2] K. Herter, Z. vgl. Physiol. *1*, 221 (1924).
[3] K. Herter, 7. int. Kongr. Entomol. (Berlin 1938).

[1] Berechnung nach A. v. Muralt, *Praktische Physiologie* (Springer-Verlag, Berlin 1948).

4. Die Temperaturempfindlichkeit ist abhängig von der Anzahl der Thermorezeptoren, da die «Schrecktemperatur» der *einseitig* des letzten Antennengliedes beraubten Tiere eine Mittelstellung zwischen normalen und beiderseits amputierten Tieren einnimmt.

5. Nach den bisherigen mikroskopischen Untersuchungen zu urteilen, sind auf den Endgliedern nur Sensillae trichoideae vorhanden, die jedoch in zwei verschiedenen Typen vorkommen. Welcher Haartyp als Thermorezeptor anzusprechen ist, konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden.

Die Versuche werden noch fortgeführt und sollen insbesondere auf weitere Tierarten ausgedehnt werden. Die eingehende Beschreibung wird später an anderer Stelle erfolgen.

Herbert Gebhardt

Zoologisches Institut der Universität Mainz, den 28. März 1951.

Summary

A temperature gradient is described in which the temperature of the air is measured. The "avoiding reaction" of normal and partially amputated insects is established, and a comparison of the results shows that in *Dorcus parallelepipedus* L. (Coleoptera) the 3 distal segments of the antennae and the maxillar palps are sensitive to temperature. Of great importance is the last segment of the antennae in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteropterae), because after its removal, the "avoiding reaction" suddenly increases at 4° C. Probably the trichoid sensillae are specialized receptors for temperature; their number seems to be important for the sensitivity to temperature.

Observations on Staining Affinity and Morphology of Mammalian Spermatozoa

Lasley *et al.*[1] and Blom[2] used Opal blue-eosin and Negrosin-eosin stains for the differentiation of live and dead sperm respectively. The underlying principle of the staining technique is that the dead sperm take up the stain while the live ones remain unstained. Blom[3], Keaty and Hamblen[4], and Haq and Rollinson[5] used Methyl-violet, Eosin-hematoxylin and Haemalum-eosin stains for studying sperm morphology respectively. Little information is available with regard to the comparative staining affinity of mammalian spermatozoa. In the present note the differences in the staining affinity, swelling ability, granularity, and an abnormality of the galea capitis have been recorded.

During the routine microscopic examination of the ram semen smears stained with Romanowsky stains, it was observed that the galea capitis of a few of the sperm were more deeply stained than the rest of the sperm (fig. 1 *a*). This indicates that the degree of staining affinity of the galea capitis varies with the individual sperm. When the ram semen samples were submitted to the so-called temperature shock and then stored for varying periods under adverse conditions, the galea capitis of the sperm appeared somewhat swollen and it presented a granular appearance (fig. 1 *b*). It was observed that a few of the ram sperm showed a typical depression at the anterior end of the sperm head (fig. 1 *c*). This condition was observed during spring season when the young Suffolk ram begins to show a seasonal decline in the reproductive processes. This peculiar abnormality might be connected with the arrested process of spermatogenesis which was observed on microscopic examination of the testes of the ram but its exact etiology needs further investigation. The results and the staining technique will be described in detail elsewhere.

I am thankful to Drs. A. Walton and J. L. Hancock for their help and to Mr. J. A. F. Fozzard for the microphotographs.

M. Maqsood

School of Agriculture, University of Cambridge, England, January 19, 1951.

Zusammenfassung

Mikroskopische Untersuchung der nach Romanowsky gefärbten Ausstriche von Schafbocksamen ergab, daß der Grad der Farbaufnahmebereitschaft der Galea capitis je nach dem einzelnen Samen schwankt. Unter ungünstigen Bedingungen erscheint die Galea leicht gequollen und gekörnt. Eine typische Eindellung am Vorderende des Samenkopfes konnte im Frühling beobachtet werden, wenn der Schafbock eine jahreszeitliche Abnahme seines Begattungstriebes aufweist. Diese merkwürdige Anomalie könnte mit der gehemmten Spermatogenese im Zusammenhang stehen, welche bei mikroskopischer Untersuchung der Schafbockshoden festgestellt wurde.

[1] J. F. Lasley, G. T. Easley, and F. F. McKenzie, Anat. Rec., *82*, 167 (1942).

[2] E. Blom, J. Fertility and Sterility *1*, 176 (1950).

[3] E. Blom, Skandinavish Vet. Tidskr. *33*, 428 (1943).

[4] E. C. Keaty and E. C. Hamblen, J. Clinical Endocrinol. *6*, 286 (1945).

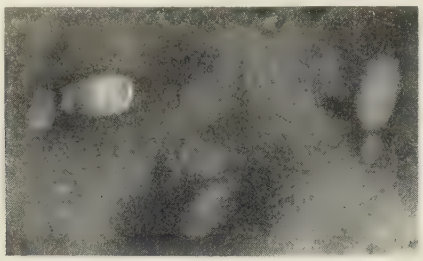
[5] I. Haq and D. H. L. Rollinson, Vet. J. *104*, 41 (1948).

a *b* *c*

Fig. 1 *a*.–Differences in the staining affinity of ram sperm. × 1300. Fig. 1 *b*.–Swelling ability and granular appearance of galea capitis of ram sperm. × 1300. Fig. 1 *c*.–A typical head abnormality of the ram sperm. × 1300.

An Abnormality of Mammalian Spermatozoa

Lagerlof, McKenzie and Berliner, Swanson and Herman, Gunn et al., Williams, Haq, Blom[1] and others have described various types of abnormal sperms in a number of species of animals. It appears that the following sperm abnormality, observed in the rabbit semen, has not been described so far.



Microscopic examination of the semen samples collected by means of an artificial vagina from the buck rabbits, showed that a small percentage of the sperm heads had protoplasmic masses instead of tails (fig. 1). On histological examination, a large number of the seminiferous tubules of the testes showed arrested spermatogenesis while others showed marked atrophic and degenerative changes. It appears that this abnormality was associated with defective spermatogenesis which ultimately resulted in the arrested development of the sperm tails. These inbred buck rabbits were classed as infertile in view of their poor breeding records. It was interesting to find that thyroid therapy stimulated spermatogenesis and greatly improved the semen quality of the treated buck rabbits. Detailed results will be described elsewhere. M. Maqsood

School of Agriculture, University of Cambridge, England, March 5, 1951.

Zusammenfassung

Es wird eine morphologische Abnormität der Kaninchenspermien beschrieben: Anstelle des Schwanzes befindet sich hinter dem Samenkopf eine protoplasmatische Masse. Diese Abnormität wurde am Samen von Kaninchen mit sehr schlechtem Fruchtbarkeitsgrad beobachtet. Mit Schilddrüsentherapie konnte die Samenqualität der betreffenden Kaninchen im Vergleich zu Kontrolltieren bedeutend verbessert werden.

[1] N. Lagerlof, Acta path. microbiol. Scand. Suppl. *19*, 47 (1934). – F. F. McKenzie and V. Berliner, Mon. Agr. Exp. Stat. Res. Bull. *265*, 85 (1937). – E. W. Swanson and H. A. Herman, J. Dairy Sci. *24*, 321 (1941). – R. M. C. Gunn, R. N. Sanders, and W. Granger, Bull. Coun. Sci. Industr. Res. Australia *148*, 105 (1942). – W. W. Williams, Connecticut Med. J. *1*, 538 (1943). – I. Haq, Brit. Vet. J. *105*, 114 (1948). – E. Blom, Fertility and Sterility *1*, 223 (1950).

Use of Track Autoradiography in Studies on the Sulfur Metabolism of Connective Tissue

Preliminary Results obtained on Adult Cartilage

The problem of the fate of inorganic sulfate administered to animal tissues has been dealt with by some workers during the last decade. Borsook *et al.*[1] using labelled sulfate in the human body were the first to propose an exchange between inorganic sulfate administered and tissue sulfate. Further studies by Singher *et al.*[1] on rats showed that the radioactive sulfate given was held mainly by bone and bone marrow. These findings were confirmed by Dziewiatkowski[2], and the same author (Dziewiatkowski *et al.*[3]) reported that suckling rats given labelled sulfate sulfur retain S^{35} in articular cartilage, and it is suggested that the $S^{35}O_4$-ion is used in the synthesis of chondroitin sulfate. Layton *et al.*[4], injecting pregnant rats with labelled sodium sulfate, were able to show that the radioactive material had crossed the placental barrier and was fixed in mesenchymal tissues of the embryos. The same authors[5] cultured tissues from chicken embryos of varying age on a medium containing carrier-free S^{35} as SO_4-ions, and found a fixation of the isotope in various tissues.

To sum up: the investigations hitherto performed have shown that inorganic sulfate sulfur administered is partly utilized in the tissues. These results, however, are mainly based on studies on embryonic or growing tissues. But it may be supposed that even adult cartilage has a certain rate of sulfate ion fixation. Cartilagineous structures would therefore be suitable for autoradiographical studies. No investigations on S^{35} adopting the autoradiographic technique have been published so far as we know. The new method of track autoradiography, which has been developed recently, gives high sensitivity and efficiency due to use of highly sensitive nuclear track emulsions. As S^{35} has a very low β-ray energy, 0·169 MeV, this isotope is very suitable for this type of autoradiography[6]. Useful data regarding the more exact topographical determinations of the labelled sulfate ions might thus be obtained by using this technique.

The present paper deals with the uptake of labelled sulfate ions given as $Na_2S^{35}O_4$ in catilagineous tissues of adult rats by means of track autoradiography.

Experimental

Adult albino rats were given carrier-free $Na_2S^{35}O_4$[7] by intraperitoneal injections in the form of a single dose of $7{\cdot}0 \cdot 10^6$ counts/min/100 gm body weight. A total of 19 rats were used.

All the animals were placed in individual wire cages and given a standard diet and water *ad lib.*

The rats were killed 21, 49, 54, 73 and 77 hours after the administration of the labelled sulfate. Blood samples were taken by puncture of the heart under ether anesthesia immediately before death. The tissues to be examined were taken out quickly after death and washed in physiological saline. Some nasal septa were taken for activity determinations by the use of a 2·4 mg per cm^2 mica end-window Geiger-Müller tube. The blood was pipetted directly into the measuring cup, haemolysed, dried and measured. A correction curve was made to get the self-absorbtion of the sample. The nasal septa were cleaned from the mucous coat, re-washed in physiological saline, and dried flattened out on mica sheets. After drying, thin areas were trimmed off. The

[1] H. Borsook, G. Keighley, D. M. Yost, and E. McMillan, Science *86*, 525 (1937).

[1] H. O. Singher and L. Marinelli, Science *101*, 414 (1945).

[2] D. D. Dziewiatkowski, J. Biol. Chem. *178*, 197 (1949).

[3] D. D. Dziewiatkowski, R. E. Benesch, and R. Benesch, J. Biol. Chem. *178*, 931 (1949).

[4] L. L. Layton, Doris R. Frankel, and Sylvia Scapa, Arch. Biochem. *28*, 142 (1950).

[5] L. L. Layton, Doris R. Frankel, and Sylvia Scapa, Cancer *3*, 275 (1950).

[6] D. Campbell (in press).

[7] Obtained from AERE, Harwell, England.

septa are regarded as "infinitely thick sources" and corrections for self-absorbtion were obtained in accordance with the method of ATEN[1]. The activity was measured with and without absorber, the dried cartilage weighed and the area measured in a projection apparatus.

Samples of trachea, proc. ensiformis, ear, nasal septum and cornea were frozen in liquid air and dehydrated in chilled and dried alcohol at −35°C and embedded in paraffin *in vacuo* according to a method worked out by one of us[2].

Sections cut at 10 μ were floated on nuclear track plates (Kodak *NT* 4), deparaffinized, exposed for 48 hours and developed. To get rid of accumulated cosmic ray tracks, the plates were eradicated in humid air immediately before use. During exposure the plates were placed in a cosmic ray shield. After the developing procedure the sections were stained in 0·01 per cent Azur I in 20 per cent alcohol and mounted in Permount.

The autoradiograms were studied in the microscope using a 60× apochromatic objective and a 15× compensation eye piece with a square-net placed in the diaphragm which limited an area of 1500 μ^2 at the magnification used. To get data on the distribution of the tracks in the different structures, countings were performed with the aid of the square-net.

Thus 20 countings were made with the square-net area within the central part of the tracheal cartilage. For comparison similar countings were performed within the connective tissue structures of the mucous coat of the trachea, and within the emulsion beside the section. Four rats were used for such determinations. Two of them were killed 54 hours and the other two 77 hours after injection of the labelled sulfate.

Results and discussion

Of the 19 rats used in these experiments, 15 were used for activity measurements of blood and nasal septum in the Geiger-Müller counter. Blood activity seems to be obtained with sufficient accuracy (10%), considering the great individual variations, by measuring directly on the dried sample. The dried flat nasal septum is a rather homogeneous structure with an area of 25 to 40 mm^2 and about 100 microns in thickness. A direct activity measurement on such samples is naturally rather rough. With proper corrections, as outlined by ATEN[1], however, the accuracy seems to be quite sufficient. The results of these measurements are shown in table I.

Table I

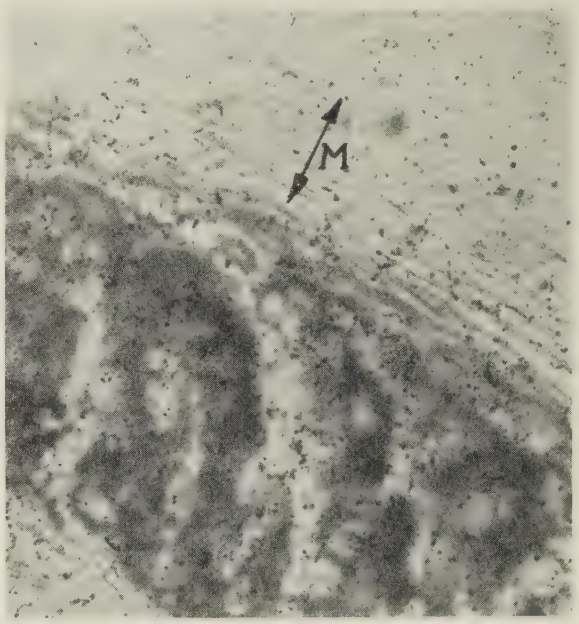
Group	No. of animals	Hours after injection	Counts/min/gm (M)	
			Blood	Cartilage
I	5	21	3,000	52,000
II	5	49	1,300	78,000
III	5	73	140	8,200

The figures given are mean values of five rats in each group. From this table it is seen that the concentration of S^{35} in the blood falls rapidly during a relatively short time. This is in accordance with the results of DZIEWIATKOWSKI. In contrast to the rapid fall of the activity in blood, a pronounced rise is found in the cartilage of the nasal septum followed by a decrease of activity after 49 hours. Comparing the figures of activity of the tissue examined by DZIEWIATKOWSKI with our figures on nasal septa, it is obvious that the value of specific activity in the cartilage examined by us is greater than in any other tissue. These results give evidence of a high rate of incorporation of radioactive sulfate ions even in adult cartilage. The high specific activity for bone marrow and extract of bone marrow reported by DZIEWIATKOWSKI may be explained as being due to contamination of the marrow with cartilagineous tissue.

Table II

Animal	Hours after injection of S^{35}	Number of tracks ($M \pm \varepsilon$) in		
		cartilage	mucosa	background
1	54	$10{\cdot}7 \pm 2{\cdot}7$	$2{\cdot}8 \pm 1{\cdot}3$	$0{\cdot}6 \pm 0{\cdot}2$
2	54	$9{\cdot}1 \pm 1{\cdot}4$	$1{\cdot}5 \pm 0{\cdot}9$	$0{\cdot}3 \pm 0{\cdot}1$
3	77	$8{\cdot}9 \pm 0{\cdot}6$	$2{\cdot}3 \pm 0{\cdot}3$	$0{\cdot}4 \pm 0{\cdot}1$
4	77	$6{\cdot}7 \pm 1{\cdot}7$	$0{\cdot}7 \pm 0{\cdot}9$	$0{\cdot}1 \pm 0{\cdot}1$

The autoradiograms obtained were satisfactory. The sections showed well preserved tissue which stained quite well. The metachromatic tint of the cartilage made an orientation within the sections very simple. By proper handling of the slides we got practically unstained emulsions, which were perfectly translucent with few fog grains. The tracks of the β-rays were easily recognized built up by densily exposed, closed packed grains (see figure). The tracks were conveniently separated from each other and the starting points could mostly be determined exactly.



Rat trachea showing numerous tracks in the cartilage and a few in the connective tissue of the mucosa (M). Background fog without any tracks in the upper right corner (250×).

The results obtained by counting the tracks on the autoradiograms are given in table II for the cartilage and mucosa of trachea of four rats.

From this table it is evident that the number of tracks is very high in the tracheal cartilage as compared

[1] A. H. W. ATEN, Nucleonics *6*, 68 (1950).
[2] B. H. PERSSON (unpublished results).

with the mucosa. Very few tracks were observed in the emulsion beside the sections. This background is due to cosmic rays, which reach the plate during exposure in spite of the shield.

The typical distribution of the tracks is clearly seen in the photomicrographs (fig. 1), which show the section lying over the emulsion.

The results obtained in this work show that the method of track autoradiography may be capable of giving quantitative values of activity of S^{35} in tissue structures even within a minute volume of the section. In the present preliminary work, the capacity of the method has of course not been fully utilized in this respect. Further studies with S^{35} are proceeding and possible improvements of the track autoradiographical method are being searched for.

Dag Campbell and Bengt H. Persson

Department of Histology, University of Upsala, January 15, 1951.

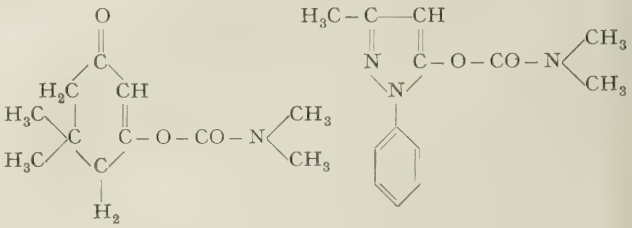
Zusammenfassung

Die Fixierung von radioaktiven Sulfationen in ausgewachsenem Bindegewebe von Ratten wurde mit Hilfe von Spurautoradiographie studiert. Die Autoradiogramme zeigen eine deutliche Konzentration von S^{35} im Knorpel und verhältnismäßig wenige Spuren in anderen Bindegeweben. Die angewandte autoradiographische Methode ermöglicht die Bestimmung der Aktivität von S^{35} innerhalb sehr kleiner Gewebegebiete.

Zur Spezifität sogenannter Esterasegifte

Die Hemmung der zentralen und peripheren Cholinesterasen durch Diäthyl-*p*-nitrophenyl-thiophosphat (Parathion) wurde erstmals von DuBois und Mitarbeitern[1] in einer grundlegenden Arbeit beschrieben. Im Säugerorganismus zeigt dieses Insektizid einen cholinergischen Effekt und bewirkt bei höheren Dosen die für eine Erregung des Parasympathikus bzw. Vagus durch Azetylcholin typischen Symptome. Noch stärker treten die Wirkungen bei dem Sauerstoffanalogen Mintacol[2] in Erscheinung, das als Miotikum und Mittel zur Glaukombehandlung empfohlen worden ist. Eine intensive Hemmung der Fermentaktivität durch Parathion und verwandte Verbindungen wurde auch bei der aus Nervengewebe von Insekten gewonnenen Cholinesterase von Metcalf und March[3] beobachtet. Die beim Insekt auftretenden toxischen Symptome stehen in einer direkten Beziehung zum Ausmaß der Esterasehemmung; bei Eintritt des Todes wurde eine vollständige Blockierung des Enzyms festgestellt. Der Schluß erscheint berechtigt, daß diese Fermente den entscheidenden Angriffspunkt des Parathions bilden und daß somit ein ähnlicher Wirkungsmechanismus vorliegt wie bei den auch chemisch verwandten Kampfstoffen der Phosphorsäuregruppe und weiterhin bei DFP, HETP und TEPP.

In den Forschungslaboratorien der I. R. Geigy AG., Basel, sind in neuester Zeit weitere hochwirksame Insektizide entwickelt worden, die chemisch einer ganz anderen Körperklasse angehören. Unter diesen Verbindungen beanspruchen die durch Gysin dargestellten Urethane G 19258 [1] und G 22008 [2] ein besonderes Interesse.



G 19258 G 22008

Bei der Untersuchung dieser Verbindungen auf eine Inhibitorwirkung gegenüber Azetylcholinesterase wurde die Spezifität dieser Wirkung abgeklärt im Vergleich zum Effekt auf andere esterspaltende Fermente. Wir prüften die Wirkung der Präparate auf die Novocain-[3] und Cholinesterasen des menschlichen Blutes, ferner auf die Parpanitesterase[4] des Kaninchenplasmas. Die Bestimmung der Aktivität der azetylcholinspaltenden Fermente erfolgte bei einer Substratkonzentration von 0,0066 m nach der manometrischen Methode von Ammon[5], wobei die Pseudocholinesterase des Serums und die Cholinesterase aus hämolysierten Blutkörperchen getrennt zur Untersuchung kamen. Die Aktivität der Parpanitesterase wurde nach der von uns publizierten Arbeitsvorschrift[4] bestimmt. Mit gleicher Versuchsanordnung studierten wir auch das Verhalten der neuen Insektizide gegenüber der Novocainesterase. Die Substratkonzentration betrug hier 2 mg%, die analytische Bestimmung des Novocains erfolgte entgegen der zitierten Originalvorschrift[4] durch Extraktion mit Äthylendichlorid nach Bikarbonatzusatz, wobei das Pharmakon von seinem Spaltprodukt Diäthylaminoäthanol quantitativ abgetrennt werden kann. Bei den Hemmungsversuchen mit Eserin müssen die durch diese Base bedingten niedrigen Blindwerte bei allen Messungen berücksichtigt werden.

Als Vergleichspräparate haben wir das für Insekten ungiftige Parasympathikomimetikum Eserin sowie das Parathion, als typischen Vertreter der Insektizide aus der Gruppe von Phosphorsäureestern, in die Untersuchungen einbezogen. Für jedes Präparat wurde der Inhibitoreffekt bei verschiedenen Verdünnungen ge-

[1] K. P. DuBois, J. Doull, R. P. Salerno und J. M. Coon, J. Pharmacol. exper. Therap. *95*, 79 (1949).

[2] W. Wirth, Arch. exper. Path. Pharmakol. *207*, 557 (1949).

[3] R. L. Metcalf und R. B. March, J. Econ. Entomol. *42*, 721 (1949).

[1] R. Wiesmann, R. Gasser und H. Grob, Exper. *7*, 117 (1951).

[2] R. Wiesmann und C. Kocher, Z. angew. Entomol. (1951, im Druck).

[3] R. Hazard und J. Ravasse, Bull. Acad. Méd. *129*, 585 (1945); C. r. Soc. Biol. *139*, 13 (1945).

[4] R. Pulver, Arch. int. Pharmacodyn. *86*, 185 (1951).

[5] R. Ammon, Arch. ges. Physiol. *233*, 468 (1933).

	Konzentrationen, welche die Aktivität um 50% hemmen			
	G 19258	G 22008	Parathion	Eserin
Cholinesterase	$2{,}0 \cdot 10^{-4}$ m	$1{,}2 \cdot 10^{-5}$ m	$1{,}5 \cdot 10^{-3}$ m	$6{,}7 \cdot 10^{-7}$ m
Pseudocholinesterase	$1{,}6 \cdot 10^{-5}$ m	$6{,}1 \cdot 10^{-7}$ m	$9{,}6 \cdot 10^{-5}$ m	$2{,}8 \cdot 10^{-7}$ m
Parpanitesterase	$4{,}5 \cdot 10^{-8}$ m	$3{,}6 \cdot 10^{-9}$ m	$1{,}9 \cdot 10^{-5}$ m	$>0{,}3 \cdot 10^{-4}$ m
Novocainesterase	$7{,}5 \cdot 10^{-6}$ m	$2{,}0 \cdot 10^{-7}$ m	$6{,}0 \cdot 10^{-6}$ m	$1{,}5 \cdot 10^{-7}$ m

messen. Dabei ergaben sich Dosiswirkungskurven, aus welchen die Konzentrationen zu ermitteln sind, die eine Esterasehemmung von 50% bewirken.

Aus der Zusammenstellung der Versuchsergebnisse ist ersichtlich, daß die beiden neuen Insektizide G 19258 und G 22008 auffallend starke Hemmungseffekte zeigen. Dabei ist die Wirksamkeit gegenüber den verschiedenen Esterasen größenordnungsmäßig verschieden. Die *Cholinesterase* der roten Blutkörperchen wird durch sie zwar schwächer als durch Eserin, aber erheblich stärker als durch Parathion beeinflußt. G 22008 besitzt gegenüber der *Pseudocholinesterase* des menschlichen Serums nahezu eine gleich starke Wirksamkeit wie Eserin.

Die *Parpanitesterase* wird schon durch außerordentlich niedrige Konzentrationen der beiden Urethane gehemmt, während Parathion und besonders Eserin hier eine viel geringere Wirkung entfalten. Dagegen wird die *Novocainesterase* sowohl durch Eserin als auch durch die Urethane sehr stark beeinflußt. Durch geeignete Eserinkonzentrationen kann die Novocainesterase spezifisch gehemmt werden, während die Parpanitesterase aktiv bleibt. Umgekehrt kann die Parpanitesterase durch G 19258 oder G 22008 blockiert werden ohne gleichzeitige Hemmung der Novocainesterase. Das spezifische Verhalten der beiden Fermente gegenüber den Inhibitoren zeigt erneut, daß die beiden Diäthylaminoäthanolester, Parpanit und Novocain, im Organismus durch verschiedene Enzyme abgebaut werden. Diese Beobachtung bildet andererseits einen Hinweis auf die Spezifität der Esterasen (vgl. [1]).

Im Tierversuch haben wir festgestellt, daß die Parpanit und Novocain abbauenden Fermente des Serums durch sehr kleine Dosen von G 22008 *in vivo* blockiert werden. Es handelt sich dabei um eine reversible Hemmung, die nur während Stunden nachweisbar ist. Versuche zur Abklärung der praktischen Bedeutung dieses Befundes sind im Gange.

R. Pulver und R. Domenjoz

Pharmakologische Laboratorien der J. R. Geigy AG., Basel, den 14. März 1951.

Summary

The inhibitory effect of various insecticides on the esterases of the blood has been measured and compared with the effect of Eserine. The ferments which split Choline, Panparnit (Parpanit) and Procaine (Novocaine) respectively, show a different behaviour towards these inhibitors. This is interpreted as a hint to the specifity of the esterases.

[1] R. Pulver, Arch. int. Pharmacodyn. *86*, 185 (1951).

Effect of Indirubin on White Blood Cell Count of the Guinea Pig[1]

Rimington, Holiday and Jope[2] were able to isolate indirubin from urine of patients suffering from sprue. On the other hand, Friedmann and Jacobson[3] isolated three substances from urine of patients suffering from chronic myelogenous leucaemia: a yellow pigment, a colourless crystalline substance and a crystalline purple pigment. They furthermore identified the purple pigment as indirubin[1].

We thought it might be interesting to investigate the effect of this substance on the white blood cell count and on the number of circulating eosinophils of the guinea pig. We therefore injected subcutaneously 1 mg indirubin dissolved in $^1/_2$ ml olive oil. A blood cell count, a eosinophil count (direct count) and a differential count were made after 3, 6, 8, 10, 12, 24, 32 hours. The results in one guinea pig are shown in table I.

Table I

Hours	White blood cell count	Eosinophils (direct count)	Granulocytes[2]	Lymphocytes[2] + Monocytes
0	8,700	638	3,654	4,524
1	Indiribin 1 mg/$^1/_2$ cm^3 olive oil			
3	8,500	417	2,380	5,610
6	7,000	250	2,870	3,150
8	6,800	139	3,060	3,468
12	5,100	117	1,581	3,264
24	7,000	278	1,550	4,900
32	8,100	495	2,106	5,832

The effect was controlled in ten guinea pigs. During the first nine to eleven hours, there is a drop in the total amount of leucocytes of about 25 to 50%; of the eosinophils of 60 to 75%. In the control tests (4 guinea pigs), after injection of the solvent alone ($^1/_2$ ml olive oil), we found fairly constant values through the whole course of the experiment. An example is shown in table II.

Table II

Hours	White blood cell count	Eosinophils (direct count)	Granulocytes[2]	Lymphocytes[2] + Monocytes
0	11,000	239	990	9,680
1	$^1/_2$ cm^3 olive oil			
3	10,900	261	3,924	6,322
7	10,600	394	5,406	4,452
9	11,700	294	5,499	5,616
11	9,500	339	2,565	6,270
25	10,100	333	2,525	7,272
27	10,800	300	4,212	6,156

The mechanism of these changes is still not known. According to Rimington, a high-protein diet causes an increase of the amount of indirubin in the urine. Indirubin might therefore quite possibly exercise, as a protein-tryptophan-metabolite, a mere toxic inhibiting effect on the haematopoietic organs. The role of the adrenals may be an indirect one in inducing the eosinopenia, as a drop in the number of eosinophils, caused by direct ACTH injection, occurs within 2-6 hours after the injection, but is accompanied by a rise in the number of granulocytes.

As beta-indolyl-acetic acid has also been isolated from urine[3], indirubin could be a product of the metabolism

[1] Aided with a grant from the "Cancer Center" of the University.

[2] C. Rimington, E. R. Holiday, and E. M. Jope, Biochem. J. *40*, 669 (1946).

[3] E. Friedmann and W. Jacobson, Nature *157*, 337 (1946).

[1] E. Friedmann, D. H. Marrian, and M. F. Perutz, Biochim. and biophys. acta *5*, 45 (1950).

[2] Calculated: differential count (%) (W.BC/100).

[3] F. Kögl, A. J. Haagen Smit and H. Erxleben, Z. physiol. Chem. *228*, 90 (1934).

of phyto-hormone-like substances. The fact also that Büngeler[1] was able to induce leucaemia and sarcomata by chronic indol-poisoning of mice, makes further investigation of the indol-derivatives well worth while.

B. C. De Landsheere

Interne Kliniek, Ghent (Belgium), February 20, 1951.

I wish to thank Prof. Bradley and Dr. J. E. Cross, Senior Lecturer, Department of Colour Chemistry, Leeds University, for kindly supplying a sample of indirubin.

Résumé

L'indirubine a été isolée par Rimington, Holiday et Jope par extraction d'urines humaines. Friedmann et Jacobson ont par la suite extrait d'urines de malades atteints de leucémie myélogène chronique un produit cristallin pourpre, qui a été identifié comme étant aussi de l'indirubine.

Une dose unique d'indirubine en injection souscutanée (1 mg dans ½ ml d'huile d'olive) provoque chez le cobaye une leucopénie, une granulocytopénie et une éosinopénie, dont l'effet le plus manifeste se produit douze heures après l'injection.

L'auteur suppose que l'indirubine pourrait être un simple produit de catabolisme du tryptophane protidique et que son action sur le système hémopoïétique ne serait que purement toxique. D'autre part, l'acide béta-indolylacétique (auxine *b*) a aussi été extrait d'urines humaines. Il est possible que l'indirubine soit un produit du métabolisme de substances de croissance (phytohormones). Le fait encore que des leucémies et des sarcomes ont pu être provoqués chez la souris par intoxication chronique d'indol, rend l'étude plus approfondie de dérivés de l'indol intéressante.

[1] W. Büngeler, Frankf. Z. Path. *44*, 202 (1933).

Wirkung von Harnextraktstoffen auf die Bewegungsreaktionen der Leukozyten

Es ist bekannt, daß aus Schwangerenharn Stoffe gewonnen werden können, die nach Injektion am Menschen und am Tier zu Veränderungen des weißen Blutbildes führen; diese Stoffe werden dargestellt mit jenen oder analogen Verfahren, die zur Gewinnung von gonadotropem Hormon aus Urin angewendet werden[1]. Weiterhin sind Fraktionen vorhanden, welche auf die Magensaftsekretion und auf die Ulkusbildung des Magens wirken[2]. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß entweder gonadotropen Fraktionen andere Wirkstoffe beigemengt sind, welche allgemeine Zellwirkungen besitzen, oder daß aus den gonadotrop wirkenden Fraktionen solche bei verschiedenartiger chemischer Bearbeitung gewonnen werden können.

Es wurde, um etwas einfachere Versuchsbedingungen zu schaffen, der Versuch gemacht, festzustellen, ob «gonadotrope Fraktionen» Stoffe enthalten, welche direkte Zellwirkungen besitzen. Es wurde hierzu die Wirkung auf die Lokomotion der Leukozyten untersucht, und zwar wurde sowohl die Wirksamkeit auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen als auch ihre chemotaktische Wirksamkeit bestimmt. Die Versuchsanordnung war die gleiche, wie sie bereits in früheren Arbeiten benutzt wurde[1].

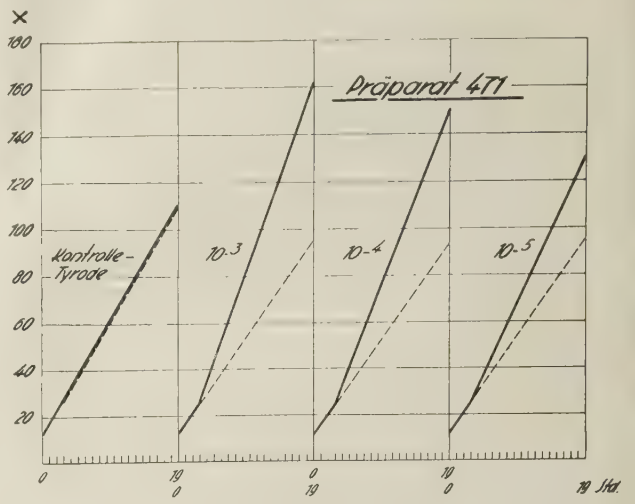


Abb. 1. Beschleunigung der Auswanderung von Leukozyten *in vitro* durch verschiedene Konzentrationen von Schwangerenharnextrakt. Abszisse: Auswanderungsfläche in relativem Maß. Ordinate: Zeit in Stunden.

Die Leukozyten vom Huhn wurden in der üblichen Weise aus dem Plasmagerinnsel nach Zentrifugieren isoliert und die Leukozyten enthaltenden Plasmastückchen in Carrelflaschen angesetzt. Für die zwei verschiedenen Versuchsanordnungen wurden die Fraktionen des gonadotropen Hormons entweder auf den festen Nährboden in Tyrode gelöst überschichtet oder als feste amorphe Substanz, bzw. in Lösung in einem Abstand von etwa 4 mm von der «Leukozytenkultur» auf die Oberfläche des Plasmanährbodens angebracht. Das Resultat der Versuche wurde nach 19 Stunden festgestellt.

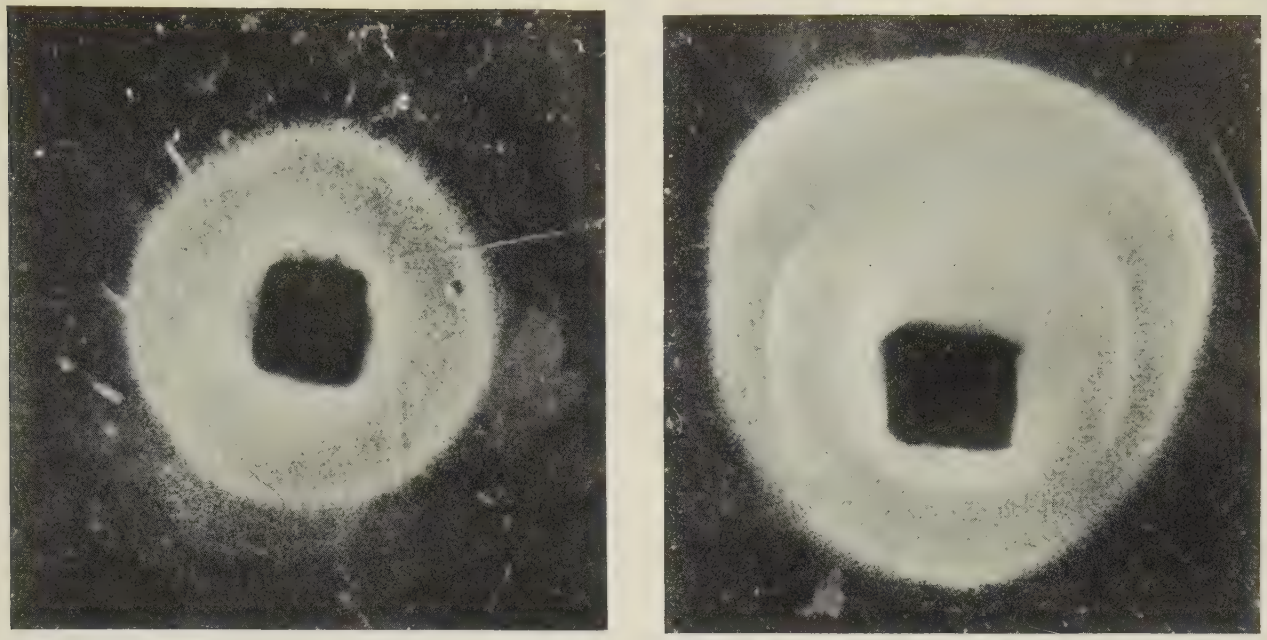
Resultate. Nach Prüfung einer größeren Reihe von Urinextrakten wurden solche Fraktionen gonadotropen Hormons gefunden, welche sowohl eine stark positive Wirkung auf die Auswanderungsgeschwindigkeit als eine chemotaktische Wirkung besitzen. Die Versuchsresultate sind in den anliegenden Abbildungen gekennzeichnet. Gewisse Fraktionen sind imstande, besonders die Auswanderungsgeschwindigkeit der Leukozyten noch in Konzentrationen von etwa 10^{-5} zu erhöhen. Andere Fraktionen enthalten mit großer Wahrscheinlichkeit Substanzen, welche eine negative Wirkung in dieser Versuchsanordnung haben, so daß es nicht ganz ausgeschlossen ist, daß auch «Rohextrakte», die in dieser Versuchsanordnung vorläufig unwirksam gefunden wurden, zufällig durch eine Mischung von positiv und negativ wirkenden Stoffen nur scheinbar unwirksam sind, so daß bei weiterer Separation der Wirkstoffe auch solche sich noch als wirksam ergeben könnten. Diese Frage bedarf weiterer Abklärung.

Die Untersuchung der von der chemotaktischen Reaktion betroffenen Zellen zeigt, daß es sich im wesentlichen um Elemente handelt, die im Plasma azidophile Granula aufweisen, aber keine Peroxydasereaktion geben. Dies ist auch bei anderen chemotaktisch wirksamen Prinzipien, wie zum Beispiel Bakterien usw., der Fall, so daß offenbar die in diesen Fraktionen nachweisbaren chemotaktisch wirksamen Stoffe sich ähnlich verhalten wie die als Bakterienchemotaxine zu bezeichnenden.

[1] R. Meier, Helv. chim. acta *24*, 134 (1941).

[1] R. Abderhalden, Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentforsch. *2*, 365 (1948/49); – H. de Watteville, Gynaecologia *126*, 207 (1948). – R. Meier, W. Schuler und F. Benz (Unveröffentlichte Arbeiten).

[2] Siehe bei F. R. Skelton und G. A. Grant, Canad. J. Res. *28*, 85 (1950).



a Abb. 2. Leukozytenkulturen *in vitro*. *b*

a Unbeeinflußte Auswanderung der Leukocyten. – *b* Chemotaktisch verstärkte Wanderung durch Harnextrakte (Vergleiche die Breite der Auswanderungszonen).

Zur weiteren Charakterisierung der wirksamen Stoffe wurde einerseits die Ultrafiltration und andererseits die Hitzewiderstandsfähigkeit derselben bestimmt. Bei Ultrafiltration nach BECHHOLD-KÖNIG bleiben die gesamten Wirkstoffe im Ultrafilterrückstand, während das Ultrafiltrat auch bei erheblichem Einengen negativ bleibt. Damit soll allerdings nicht gesagt sein, daß die Stoffe tatsächlich selber nicht ultrafiltrierbar sind, da sie nur an größeren Molekülen adsorbiert sein können. Die Thermostabilität des Präparates zu prüfen, war besonders deswegen interessant, um zu zeigen, daß sie nicht mit der gonadotropen Wirksamkeit derselben einhergeht. Die gonadotrope Wirksamkeit der Präparate wird nach dreißigminutigem Erhitzen auf 100 °C zerstört. Die Prüfung derartig erhitzter Präparate zeigt eine unveränderte Wirkung auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Leukozyten.

Die besten positiven Resultate gaben regelmäßig Schwangerenharnextrakte, während Extrakt aus Männerharn, Harn klimakterischer Frauen und Harn nicht gravider Frauen in den gleichen Konzentrationen sowie auch Serum- und Hypophysenextrakte ein negatives Resultat zeigten. Die Harnpräparate, darunter auch die wirksamen, wurden nach dem gleichen Benzoesäureadsorptionsverfahren gewonnen. Alle Präparate wurden von BENZ in unserem chemischen Laboratorium hergestellt. Diese Befunde scheinen dafür zu sprechen, daß im Schwangerenharn besondere Stoffe vorhanden sind, möglicherweise in chemischer Hinsicht dem gonadotropen Hormon nahestehend, welche eine ziemlich spezifische Wirkung auf die Lokomotion der weißen Blutzellen besitzen. Es wird weiter zu prüfen sein, ob diese Stoffe auch bei den von ALLGÖWER[1] gemachten Beobachtungen, daß das γ-Globulin chemotaktische Wirkungen besitzt, eine Rolle spielen und ob sie für pathologische oder physiologische Verhältnisse eine analoge Rolle in Geweben spielen können.

R. MEIER und BERTHA SCHÄR

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba-Aktiengesellschaft, Basel, den 26. Mai 1951.

[1] M. ALLGÖWER und H. SÜLLMANN, Exper. *6*, H. 3, 107 (1950).

Summary

It could be demonstrated that extracts prepared from urine of pregnant women besides their gonadotropic activity contain also substances with an action on the migration of leucocytes *in vitro*. They have chemotactic effects and enhance the velocity of the migration of the leucocytes.

Production of Severe Anemia without Diabetes by Combined Action of Ascorbic Acid and Alloxan

Ascorbic acid, referred[1] to as having no preventive action on alloxan diabetes, would appear, according to LAZAROW[2], LEVEY and SUTER[3], PATTERSON[4], to act synergically with alloxan potentiating the effect of this substance. Moreover, according to PATTERSON, the oxidized form of ascorbic acid seems to possess a diabetogenic activity. My own experiments disagree completely with these findings. So far I have been unable[5] to confirm the diabetogenic activity of dehydroascorbic acid, and had previously ascertained[6] that simultaneous intravenous injections, in rabbits, of ascorbic acid in doses isomolar to alloxan, cause a severe and sometimes fatal intoxication. If the animal survives, a mild diabetes follows which disappears in a few days. If the doses of ascorbic acid are increased, death occurs almost immediately.

In the dog, however, larger doses of ascorbic acid prevent the alloxan diabetes[7] but cause complex symptoms with severe anemia. 10 % ascorbic acid (1·42 mM/kg) and 5 % alloxan (75 mg/kg) were used: one half of the initial dose of ascorbic acid was injected intravenously and

[1] S. BANERJEE, Science *106*, 128 (1947).
[2] A. LAZAROW, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *61*, 441 (1946).
[3] S. LEVEY and B. SUTER, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *63*, 341 (1946).
[4] J. W. PATTERSON, J. Biol. Chem. *183*, 81 (1950).
[5] D. MERLINI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. *26*, 1005 (1950).
[6] D. MERLINI, Folia Endocrinologica *3*, 669 (1950).
[7] D. MERLINI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. *26*, 1248 (1950).

immediately after it alloxan was injected into another vein and both injections were completed at the same time. As soon as alloxan reaches the blood stream, severe toxic symptoms are observed: intense secretion from mouth, nose and eyes, urine and faeces elimination, the visible mucosa dark brown in colour, and an extensor hypertonia appears. The blood taken from a superficial vein is very dark and shows the absorption band of the methemoglobin in the red part of the spectrum with the centre at about 630 mμ.

If the animal remains alive, this syndrome gradually disappears and very slowly and with great difficulty the dog overcomes the crisis. On the following days, the diabetes does not develop; a severe anemia arises. The forementioned spectroscopic band is observed frequently in the urine as well as in the blood. The normal RBC count decreases in 7–8 days to 900,000/mm^3; the anemia is hyperchromic in character (GV = 1·1) with high neutrophilic hyperleucocytosis (W.C. 50,000/mm^3) with an appreciable left shift; remarkable anisocytosis, poikilocytosis with polychromasia, normoblasts, pronormoblasts are also observed. If the dog survives the anemia, recovery follows in about 20–30 days.

I succeeded next in proving that the anemic pattern can be produced in the dog not only by the intravenous route, but also, with some difference in the intensity of the reaction, by intraperitoneal or intramuscular injections of a mixture of the same substances. Later I obtained the same result, with slight difference in the severity of the intoxication, in the following animals: rabbit, guinea pig, rat, chicken, and pigeon.

Full details are published elsewhere[1]. The pathogenesis of these phenomena will be reported later.

D. Merlini

Institute for General Pathology, University of Pisa, January 10, 1951.

Zusammenfassung

Die gleichzeitige Injektion von Askorbinsäure und Alloxan führt beim Hund nicht zu einem Diabetes, sondern bewirkt eine schwere Anämie, die mit einer Schädigung der Erythrozyten verbunden ist.

[1] D. Merlini, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1950 (in press); Atti Soc. Tosc. Scienze Nat. 1950.

d-Lysergsäure-diäthylamid (LSD 25) im Spinnentest[1]

Nachdem die zentralnervöse Wirkung des LDS 25 aufgefunden war[2], machte ihre exakte Definition und Abgrenzung gegen die Wirkung anderer Substanzen (Mezkalin) Schwierigkeiten. Der Mensch zeigt im Versuch starke konstitutionelle und zeitliche Schwankungen, und die Untersuchungsmethoden an ihm teilen sich in subjektive (Erlebnisbericht), die stark vom Individuum abhängen, und objektive (Psychometrie bis Rorschachtest), die grobe und von dem Willen zur Mitarbeit der Versuchsperson abhängige Eingriffe in das Seelenleben darstellen. Niedere Tiere haben kein ausreichend differenziertes Zentralnervensystem. Der Spinnentest (Peters und Witt) wird an einem zentralnervös hochorganisierten Tier mit geringer individueller Schwankung ausgeführt; er benützt die starke spontane Triebhandlung des Netzbaues als empfindliches und quantitativ auswertbares Reagens auf Substanzbeeinflussung. Beim Vergleich der Reaktion des Menschen und des Spinnennetzes auf dieselbe Substanz tritt aber eine Verschiebung der Proportionen der Wirkung auf; Hauptwirkungen treten zurück und umgekehrt Nebenwirkungen in den Vordergrund des Bildes. Dies konnte für Pervitin und Strychnin[1] gezeigt werden. Daher können am Menschen ähnlich wirkende Substanzen, die aber einen verschiedenen Angriffspunkt haben, im Spinnentest Unterschiede zeigen. Die Tabelle vergleicht die Wirkung von LSD 25 und Mezkalin auf den Netzbau der Spinne *Zilla x-notata*, wofür insgesamt 194 Substanz- und Vergleichsnetze ausgemessen wurden. Über die Methodik siehe[2].

Abb. 1. 2 Sektoren aus dem unteren Teil des Netzes von Zilla.
Mittlere Schwankung der Klebfadenabstände: 0,60 mm.
Mittlere Schwankung der Winkelgröße: 2,04 Grad.

Abb. 2. 2 Sektoren aus dem Netz der gleichen Spinne am folgenden Tag, unter dem Einfluß von *LSD 25* gebaut.
Mittlere Schwankung der Klebfadenabstände: 0,31 mm.
Mittlere Schwankung der Winkelgröße: 1,23 Grad.

Abb. 3. 2 Sektoren aus dem unteren Teil des Netzes einer anderen Spinne.
Mittlere Schwankung der Klebfadenabstände: 0,59 mm.
Mittlere Schwankung der Winkelgröße: 1,74 Grad.

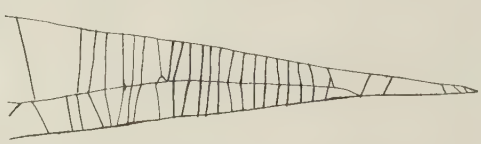


Abb. 4. 2 Sektoren aus dem Netz der gleichen Spinne wie Abb. 3 am folgenden Tag, unter dem Einfluß von *Mekcalin* gebaut.
Mittlere Schwankung der Klebfadenabstände: 1,59 mm.
Mittlere Schwankung der Winkelgröße: 2,72 Grad.

In Auswertung der Tabelle zeigt sich, daß das Dosisverhältnis LSD 25/Mezkalin [Tabelle (1)] bei Mensch und Spinne ähnlich ist; LSD 25 hat auch bei der Spinne die größere Wirkungsbreite [Tabelle (2)]. Niedere Dosen von LSD 25 zeigen einen relativ spezifischen Effekt, der dem des Mezkalin fast überall entgegengesetzt ist [Tabelle (3), (4), (6), (7), (8), (9)], wobei die vorwiegend sensorisch-zentrale Natur des Angriffspunktes von LSD 25 zum Beispiel im Klebfadenverlauf zum Ausdruck kommt [Tabelle (9)]. Die hier zum erstenmal am Spinnennetz beobachtete Zunahme der Winkelregelmäßigkeit bei

[1] Die Versuche wurden mit der freundlichen Unterstützung der Firma Sandoz AG. durchgeführt, die auch die Substanz zur Verfügung stellte.

[2] W. A. Stoll, Schweiz. Arch. Neurol. Psych. *60*, 1 (1947).

[1] D. Wolff und U. Hempel, Diss. (Tübingen 1950).

[2] H. Peters, P. N. Witt und D. Wolff, Z. vergl. Physiol. *32*, 29 (1950).

Nr.	Untersucht	LSD 25		Mezkalin
1	Wirksame Dosis	0,03–0,3γ/Tier		ca. 100γ/Tier
2	Bilder bei höchsten erreichten tox. Dosen	ca. 50–100γ Fortlaufen		ca. 200γ Krämpfe-Tod
		unter 0,05γ	*über* 0,05γ	
3	Hemmung des Netzbautriebes in % der Versuchszahl	74,1	31,2	11,8
4	Durchschnittliche Vergrößerung der Netzfläche um %	+13,4	−23,3	−16,8
5	Zahl der gegenüber dem Vortag verlängerten Netze in %	71,5	85,7	64,7
6	Vermehrung der übergroßen Sektoren gegen den Vortag um	−4	+2	+8
7	Durchschnittliche Zunahme der Winkelregelmäßigkeit in Grad	+0,84*	−0,3*	−0,81*
8	Zahl der Netze, deren Winkel regelmäßiger waren als am Vortag in %	100	28,6	17,6
9	Klebfadenverlauf	regelmäßig	regelmäßig	unregelmäßig

* Unterschiede mit dem t-Test «stark gesichert».

allen Netzen, die unter dem Einfluß niederer Dosen von LSD 25 gebaut worden sind [Tabelle (7), (8)], scheint auf einer Zunahme des Assoziationstempos bei der Anlage der Radialfäden zu beruhen. (Die Klebfadenregelmäßigkeit wurde nicht quantitativ erfaßt.) Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine bessere Verwertung des sensiblen Kontrollreizes. Dabei liegt eine qualitative Steigerung einer spontanen Leistung durch LSD 25 vor, im Gegensatz zu der erhöhten Unregelmäßigkeit durch Mezkalin [Tabelle (7), (8)]. Damit scheint uns der Spinnentest durch seine Aufgliederung der Wirkung beider Substanzen einen Hinweis dafür zu geben, daß der ähnlichen Wirkung am Menschen ein verschiedener Angriffspunkt zugrunde liegt.

P. N. Witt

Pharmakologisches Institut der Universität Bern, den 17. Januar 1951.

Summary

Investigating, with a special method, spiders' webs built under the influence of LSD 25 and Mezcaline, a difference between the two substances becomes apparent. The most striking is the improved exactitude of the angles with small doses of LSD 25, and the decreased accuracy under the influence of Mezcaline. Therefore it seems likely that the similar effect which the two drugs have on man is brought about by attacks from different points.

Subdivision of Cutaneous Afferents According to Skin Areas and Reflex Effects

It has been stated (Lloyd[1]) that the response to a single shock to an ipsilateral cutaneous nerve is indirect facilitation of the flexor motoneurones and a likewise indirect reciprocal inhibition of the extensor motoneurones. With the more natural modes of stimulation to be used below, other reflex figures come to the fore (cf. Hagbarth and Naess[1]).

In decerebrate or low spinal cats the hind limb to be used was deefferented and the excitability of antagonistic motoneurones tested by recording monosynaptic responses from a ventral root.

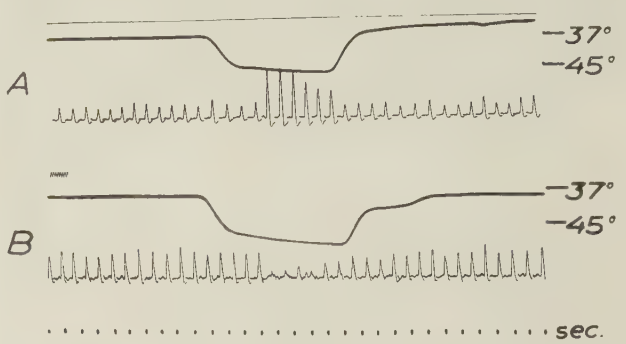


Fig. 1.—Decerebrated cat. Records from the ventral root L_7. Repeated monosynaptic test volleys obtained (A) from the gastrocnemius nerve and (B) from the deep peroneal nerve. Thermode on the intact sural nerve in the middle of the thigh. Local heating of the cutaneous nerve causes facilitation of the extensor motoneurones and inhibition of the flexor motoneurones. Upper line is temperature record, calibrated on the right in C°. Time 1000/sec.

In figure 1 the sural nerve is locally heated (thermode technique) to stimulate the small afferents selectively (C. v. Euler[2]). The reflex effects are shown in gastrocnemius and deep peroneal motoneurones respectively. The slowly iterated monosynaptic responses are increased on the extensor side and inhibited on the flexor side. When a similar stimulation is applied to the sural nerve in an otherwise intact animal it may cause extension of the ankle. Thus it is clear that the smallest afferent fibres of a cutaneous nerve sometimes set up ipsilateral reflex extension.

The extensor inhibition from a single shock to a cutaneous nerve may be followed by facilitation (Bernhard[3]). This was repeatedly verified in the present investigation. Sometimes, however, in a series of observations, exceptional results appeared. It turned out that the effect could be modified by applying the conditioning shock to different branches of the same cutaneous trunk. Figure 2 shows the excitability changes in the motoneurones of gastrocnemius following a conditioning shock to a small cutaneous branch passing over the heel. There is no inhibition to be seen, only a facilitation, the latency of which does not exceed 4 msec. Thus also the fastest fibres of a cutaneous nerve are sometimes capable of causing ipsilateral extensor facilitation.

The single shock technique, as well as the thermode technique described above, represent an unnatural mode of stimulation, and, by using such methods, it may be difficult to distinguish between functionally different groups of sensory units. By leaving the cutaneous nerves intact and stimulating the skin itself by adequate means, striking results were otained which emphasize the importance of truly physiological conditioning.

[1] D. P. C. Lloyd, J. Neurophysiol. *9*, 439 (1946).

[1] K-E. Hagbarth and K. Naess, Acta physiol. Scand. *21*, 336 (1950).

[2] C. v. Euler, Acta physiol. Scand. *14*, suppl. 45 (1947).

[3] C. G. Bernhard, Acta physiol. Scand. *6*, suppl. 47 (1947).

In a decerebrate animal both hind limbs were denervated, leaving only the pure cutaneous nerves such as the sural and the saphenus, on the side of the leg to be used. The monosynaptic test volleys were continuously elicited from the central stump of the gastrocnemius nerve. By pinching the skin of the leg it proved possible to influence the amplitude of the test responses in a differential fashion by applying the stimulation to different areas of the skin. When pinching the skin over the heel, for example, a marked facilitation of the gastrocnemius motoneurones was obtained; but when a similar stimulation was applied to the surface over the ventral side of the ankle an equally prominent inhibition appeared.

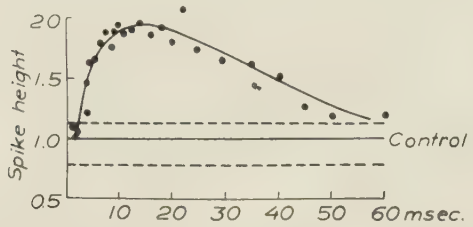


Fig. 2.—Decerebrated cat. Excitability changes of gastrocnemiu motoneurones following a conditioning shock to a small cutaneous branch running over the heel.

In order to map out the facilitatory and inhibitory skin areas for the motoneurones of different muscles it was necessary to preserve all the skin afferents of the leg. Thus, in the experiment presented in figure 3, the innervation of the leg was left intact except for the gastrocnemius, the deep peroneal and the quadriceps nerve which were severed. From the central stumps of any of the latter nerves, monosynaptic test volleys could be evoked (the rectus component of the quadriceps had been removed). When pinching the skin great care was taken to ascertain that no movements of the leg or any other stimulation of deep afferents occured.

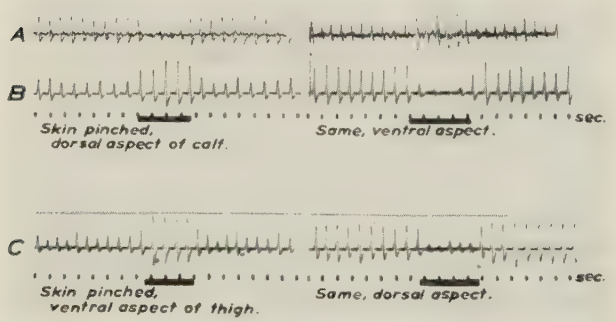


Fig. 3.—Decerebrated cat. Records (*A* and *B*) from the ventral root L_7 and (*C*) from the ventral root L_6. Repeated monosynaptic test volleys obtained (*A*) from the deep peroneal nerve, (*B*) from the gastrocnemius nerve and (*C*) from the quadriceps nerve (the rectus component removed). By pinching the skin of the leg the excitability of the motoneurones is influenced and the effect is changed by varying the localisation of the skin stimulus. See text.

It was found that facilitation of the gastrocnemius motoneurones could be provoked from a skin area localized on the dorsal side of the leg and extending from about the middle of the thigh to just beneath the heel. From the surface of the rest of the leg, inhibition of the gastrocnemius motoneurones was obtained. The antagonistic flexor motoneurones (test shocks on the deep peroneal nerve) were influenced in the opposite way. They were inhibited from the extensor facilitatory area just described, and facilitated from the rest of the leg. The results were quite constant and easy to repeat.

The extensor motoneurones of the quadriceps muscle were also influenced by pinching the skin. They were facilitated from the skin over the ventral side of the thigh and the knee and inhibited from other parts of the leg. The extensor facilitatory skin areas are mainly distributed over the extensor muscles concerned.

The skin stimuli employed have usually been mechanical and nocuous. But local heating to extreme temperatures (above 60—70° C) as well as moderate pressure on the skin were sometimes found to be adequate stimuli for the reflexes studied.

On the basis of the present investigation it is concluded that the reflex patterns which can be obtained from the extero-ceptors of the limb are more complex than has generally been thought. The nature of the response is fundamentally determined by that particular skin area of the leg to which stimulation has been applied. For both flexor and extensor muscles, specific excitatory and inhibitory skin areas have been found. The end-organs responsible for these reactions are chiefly activated by nocuous stimuli (mechanical or thermal) but moderate pressure on the skin is also an adequate mode of stimulation. In the large cutaneous nerve trunks, leg afferents from different skin areas are intermingled, and, therefore, in the usual reflex work sensory units with very different reflex functions are indiscriminately activated by shocks to such nerves. The present results suggest that analytical penetration of the organization of skin reflexes has to be based on afferent selectivation. These results are part of a more extensive study which is in course of preparation.

K-E. Hagbarth

Nobel Institute for Neurophysiology, Karolinska Institutet, Stockholm, January 31, 1951.

Zusammenfassung

Es wurden die ipsilateralen Reflexwirkungen von Hautafferenzen in der hintern Extremität der Katze studiert. Es konnte gezeigt werden, daß in den großen Hautnervenstämmen sensorische Elemente mit verschiedenen Reflexfunktionen gemischt sind. Für Beuge- und Streckmuskeln wurden spezifische erregende und hemmende Hautareale gefunden.

PRO LABORATORIO

Méthode de dosage du ^{45}Ca et du ^{32}P au cours de l'emploi simultané des deux radioisotopes

Nombreux sont les importants travaux biochimiques utilisant le radiophosphore comme indicateur pour l'étude du métabolisme des tissus osseux. Pendant très longtemps, à cause de certaines difficultés d'ordre technique, on était limité à l'utilisation du radiophosphore pour l'étude de ces problèmes; mais à l'heure actuelle, il est possible de préparer du radiocalcium ayant des activités spécifiques suffisantes. Aussi différents auteurs ont déjà utilisé ce radioisotope au cours des recherches du métabolisme du calcium. Dans certains cas, il est important aussi de pouvoir faire le parallélisme entre le métabolisme du calcium et celui du phosphore. C'est dans le but de pouvoir faire cette compa-

raison, chez le même sujet, que ARMSTRONG et BARNUM[1] ont eu l'idée d'administrer, en même temps, le radiocalcium et le radiophosphore. Avant de faire les mesures radioactives, les auteurs séparent le calcium du phosphore par la méthode chimique suivante:

Les cendres résultant de la calcination des tissus à 500° sont dissoutes dans l'acide chlorhydrique dilué. Cette solution est additionnée d'un excès d'oxalate d'ammonium et centrifugée. Au liquide surnageant est ajoutée de l'ammoniaque jusqu'au pH 4 et la solution est encore centrifugée. Le pH de la solution surnageante est amené à 5 et le tube est centrifugé, après l'avoir laissé reposer pendant 24 heures. Le liquide surnageant et les eaux des deux lavages du précipité sont introduits dans un ballon jaugé. Cette solution renferme le radiophosphore. Le précipité d'oxalate de calcium est ensuite redissout et de nouveau précipité deux fois, avant de faire le dosage chimique du calcium et les mesures radioactives.

Cette technique a été suivie par les auteurs pour l'analyse de différents tissus ou organes renfermant des quantités plus ou moins importantes de calcium. De notre côté, nous avons essayé de reproduire la même technique pour le dosage du ^{45}Ca et du ^{32}P dans des échantillons renfermant très peu de calcium ou de phosphore et au cours d'expériences qui ne permettaient pas de prélever des quantités importantes de tissus ou d'excréta.

Ayant rencontré, dans ces conditions, de nombreuses difficultés et ayant observé des écarts appréciables dans les mesures, nous avons fait une étude systématique pour contrôler cette technique de dosage, et c'est ainsi que nous avons été conduit à mettre au point une nouvelle méthode de dosage du ^{45}Ca et ^{32}P, au cours de l'emploi simultané des deux radioisotopes. Pour ce faire, nous avons essayé de mettre à profit la très grande différence qui existe entre l'énergie des rayons bêta du ^{45}Ca et ceux du ^{32}P. Le principe de cette nouvelle méthode de dosage peut se résumer ainsi. Un écran mince en aluminium d'environ 0mm5 d'épaisseur suffit pour arrêter tous les rayons bêta de faible énergie du ^{45}Ca, tandis que ce même écran n'arrête qu'une petite partie des rayons bêta émis par le radiophosphore. Reproduisant toujours les mêmes conditions géométriques près du tube compteur, nous pouvons tout d'abord déterminer, à l'aide d'une préparation ne contenant que du ^{32}P, la proportion des rayons bêta absorbés par cet écran en aluminium. Pour doser le ^{45}Ca et le ^{32}P dans un échantillon, il suffit de mesurer tout d'abord la radioactivité du mélange des deux radioisotopes, puis de faire une mesure avec interposition de l'écran en aluminium sur le trajet des rayons. La première mesure donne l'activité totale résultant des deux radioisotopes et la seconde, corrigée du facteur déterminé précédemment, nous donne l'activité due à la présence du radiophosphore. La différence donne l'activité due au radiocalcium.

Pour vérifier la validité d'une telle méthode et afin de la comparer avec la précédente, au point de vue de la précision, nous avons préparé une série de solutions (tableau 1) contenant, soit du ^{45}Ca (*G*), soit du ^{32}P (*E*), soit encore les deux radioisotopes ensemble (*A* à *D*). Nous avons également fait varier la quantité de support: très faible, elle est de l'ordre du gamma (10^{-6} g), très forte, elle est de l'ordre de 0mg1. Nous prélevons toujours la même partie aliquote pour chacune de ces solutions et les quantités de calcium et de phosphore correspondantes sont indiquées dans les colonnes 2 et 3 du tableau 1. Les solutions *A* à *D* renferment les mêmes quantités de radiophosphore ou de radiocalcium que les solutions *E* ou *G*. L'activité radioactive des solutions *A* à *D* est mesurée, d'abord, sans l'interposition d'aluminium, ensuite, avec interposition d'un écran en aluminium de 0mm5 d'épaisseur. Ces valeurs sont portées dans les colonnes 6 et 7. Les chiffres indiqués dans la colonne 8 représentent les quantités de radiophosphore calculées, après avoir déterminé expérimentalement que l'écran en aluminium absorbe 64,5% des électrons émis par le radiophosphore.

D'autre part, les mêmes parties aliquotes de ces solutions sont traitées chimiquement pour séparer le phosphore du calcium par précipitation de ce dernier à l'état d'oxalate, ou bien, en suivant le mode opératoire décrit par ARMSTRONG et BARNUM (valeurs entre parenthèses). Les activités radioactives ainsi déterminées sont indiquées respectivement dans les colonnes 9 et 12 du tableau.

Ces valeurs représentent l'activité du précipité (^{45}Ca) ou du filtrat (^{32}P), déduction faite du radiophosphore ou du radiocalcium ayant été éventuellement

[1] W. D. ARMSTRONG et C. P. BARNUM, J. Biol. Chem. *172*, 199 (1948).

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Solution	Ca (γ)	P (γ)	cpm ^{45}Ca	cpm ^{32}P	cpm $^{45}Ca + ^{32}P$ Omm. Al	cpm $^{45}Ca + ^{32}P$ 0,5 mm Al	cpm. ^{32}P calculé	cpm ^{32}P après séparation chimique	cpm ^{45}Ca entraîné	cpm ^{45}Ca calculé par différence	cpm ^{45}Ca après séparation chimique	cpm ^{32}P entraîné	$^{45}Ca + ^{32}P$ cpm activité totale retrouvée
A	7,4	192	765	672	1440	236	665	680 (736)	0 (111)	775	557 (471)	0 (0)	0 (1318)
B	7,4	6	765	672	1342	210	592	490 (471)	65 (190)	750	589 (344)	141 (190)	1285 (1195)
C	189	6	765	672	1443	237	668	509 (564)	0 (0)	775	705 (650)	241 (196)	1455 (1410)
D	189	192	765	672	1465	247	697	674 (690)	0 (0)	768	744 (730)	0 (19)	1418 (1439)
E	0	192	pas	672	–	–	–	630 (645)	0 (0)	–	0 (0)	0 (0)	– –
G	189	0	765	pas	–	–	– moyenne: 656	0 (0)	0 (0)	– moyenne: 767	730 (728)	0 (0)	– –

entraîné au cours de la séparation chimique; ces quantités entraînées ont été déterminées par des mesures d'absorption et les activités correspondantes sont portées dans les colonnes 10 et 13. Dans la colonne 14, sont indiquées les activités totales (^{45}Ca et ^{32}P) retrouvées après chacune des séparations chimiques. Chacune des valeurs indiquées dans le tableau est une moyenne des résultats obtenus au cours de trois ou quatre opérations.

Un examen d'ensemble du tableau montre que les quantités totales de radiocalcium et de radiophosphore retrouvées dans les différentes fractions représentent bien les quantités mises en expérience. De plus, quelque soit le mode de séparation chimique adopté, une partie du radioisotope échappe à la séparation chimique quand la quantité de support n'est pas suffisante. Enfin, il n'y a pas de radioactivité entraînée dans le cas des solutions *E* et *G*, ce qui prouve que les valeurs observées pour les autres solutions ne peuvent pas s'expliquer par une contamination survenue au cours de la manipulation.

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que dans le cas de faibles quantités de calcium ou de phosphore stable, on obtient de meilleurs résultats, pour le dosage des radioisotopes correspondants, en adoptant la méthode basée sur la mesure d'absorption du rayonnement émis. Cette dernière méthode présente un autre avantage sérieux en faisant réaliser un gain de temps appréciable puisqu'elle supprime les très longues séparations chimiques. Enfin, signalons que le principe de cette méthode de dosage peut être appliqué aussi pour l'utilisation simultanée d'autres isotopes radioactifs.

En terminant, je tiens à remercier bien vivement M. le Prof. G. Guében pour l'aide que je lui dois. Mes remerciements vont également à Mlles N. Grisard et T. Vossius pour l'aide technique reçue au cours de la réalisation de ce travail.

Jean Govaerts

Institut de physique nucléaire de l'Université de Liège (Belgique), le 28 mars 1951.

Summary

A method is described by means of which radiocalcium and radiophosphorus can be used simultaneously in biological tracer work. The chemical separation is eliminated when the different beta energies of these two isotopes are used. An aluminium absorber of 0·5 mm stops all of the ^{45}Ca-β-rays, but reduces the activity of the ^{32}P by a factor of about 2·7. A sample containing both isotopes is first measured without absorber, giving the activity due to both isotopes; the activity measured with absorber multiplied by 2·7, will give the ^{32}P contribution; the ^{45}Ca contribution is then calculated from the difference.

Die Ausschaltung des Azetessigsäurefehlers bei der Brenztraubensäurebestimmung

Die auf dem Prinzip der Hydrazonbildung mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazinreagens beruhende Nachweismethode für Brenztraubensäure (BTS) nach Lu[1], Klein[2], Friedemann und Haugen[3] und anderen Autoren hat den Nachteil, daß die Reaktion für diese α-Ketosäure nicht spezifisch ist. Es reagieren vielmehr noch eine ganze Anzahl von anderen im Blut vorkommenden α-Ketosäuren, aber auch einige β-Ketosäuren unter Bildung eines gefärbten 2,4-Dinitrophenylhydrazons. In der Literatur ist schon wiederholt darauf aufmerksam gemacht worden, daß speziell die Azetessigsäure als quantitativ am stärksten ins Gewicht fallende β-Ketosäure bei der Bestimmung der BTS stört. Deshalb wurden verschiedene Verfahren zur Eliminierung der Azetessigsäure ausgearbeitet. Friedemann und Haugen halten es für ausreichend, das trichloressigsaure Blutfiltrat über Nacht im Eis stehenzulassen, um den angeblich geringen Störungseffekt der Azetessigsäure zu beseitigen. Klein benützt zur Enteiweißung Wolframat-Schwefelsäure statt Trichloressigsäure und läßt das mit Äthylazetat extrahierte Hydrazon über Nacht stehen. Elgart und Nelson[1] kochen nach Enteiweißung mit Wolframat-Schwefelsäure das Filtrat unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure eine Stunde lang im Wasserbad. Dasselbe Verfahren, in leicht modifizierter Form, benützen Lestradet und Guest[2].

Wir haben uns im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über den BTS-Stoffwechsel bei der diabetischen Azidose die Frage vorgelegt, in welchem Maße die Azetessigsäure bei der BTS-Bestimmung nach Friedemann und Haugen Fehler verursachen kann. Die aus diesem Grunde vorgenommenen Bestimmungen zur Feststellung der Hydrazonbildung aus Azetessigsäure in wässeriger Lösung sowie bei Zusatz zu Blut sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Untersucht wurde der Dosenbereich von 100–1000 γ, das entspricht etwa einem Azetessigsäuregehalt des Blutes von 10–100 mg%. Wie die erhaltenen Werte zeigen, werden in wässeriger Lösung zwischen 6,0 und 7,1% schwankende Azetessigsäuremengen als BTS nachgewiesen. Im Zusatzversuch zu Blut liegen die Werte mit 6,6 bis 8,0% etwas höher. Da bei der diabetischen Azidose eine stärkere Vermehrung der Azetessigsäure regelmäßig vorkommt, bedeutet die Ausschaltung dieses Fehlers bei der Bestimmung der BTS eine unbedingte Notwendigkeit.

Das von Elgart und Nelson vorgeschlagene Verfahren des einstündigen Kochens unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure schien uns wegen der bekannten Empfindlichkeit der Ketosäuren gegen starke chemische Eingriffe ungeeignet. Wenn man das Blutfiltrat 1 Stunde lang der Hydrolyse in stark saurer Lösung bei 100° aussetzt, besteht die Gefahr unkontrollierbarer und tiefgreifender Zerstörungs- und Umwandlungsprozesse, die die nachfolgende Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin unübersichtlicher machen.

Da anderseits die Azetessigsäure durch starke Zersetzlichkeit (unter Bildung von Azeton und Kohlensäure) in saurer Lösung beim Erwärmen charakterisiert ist, haben wir versucht, mit einer kürzeren Kochzeit auszukommen. Außerdem haben wir auf einen besonderen HCl-Zusatz verzichtet, denn bei der Enteiweißung mit Trichloressigsäure besteht bereits ein pH von 1. Diese Versuche ergaben das vollständige Verschwinden der Azetessigsäure schon nach 5 Minuten dauerndem Einstellen in kochendes Wasser (siehe Tabelle I). Papierchromatographische Nachprüfung hat ergeben, daß bei diesem Verfahren tatsächlich alle Azetessigsäure zerstört wird.

Weiter erhob sich die Frage, ob durch das fünfminutige Erwärmen auch Verluste an BTS verursacht werden. In Tabelle II und III sind die gefundenen Werte vor und nach der Kochprozedur angegeben. Es zeigt sich sowohl für die wässerige Lösung als auch für den BTS-Zusatz zum Blut, daß der Kochverlust unter 10% beträgt. Wir

[1] G. D. Lu, Biochem. J. *33*, 249 (1939).

[2] D. Klein, J. Biol. Chem. *137*, 311 (1941).

[3] T. E. Friedemann und G. E. Haugon, J. Biol. Chem. *147*, 415 (1943).

[1] S. Elgart und N. Nelson, J. Biol. Chem. *138*, 443 (1941).

[2] H. Lestradet und G. M. Guest, Presse méd. *59*, 375 (1951); Ann. Biol. Clin. *9*, 183 (1951).

Tabelle I
Hydrazonbildung aus azetessigsaurem Natrium in wässeriger Lösung und bei Zusatz zu Blut

Einwaage in γ azetessigsaurem Natrium	*Als BTS direkt*		*Als BTS in % der eingewogen. Azetessigsäure*		BTS nach Kochen
	in wässeriger Lösung mg%	bei Zusatz zu Blut mg%	in wässeriger Lösung	bei Zusatz zu Blut	
100	0,65	0,72	6,5	7,2	–
200	1,26	1,60	6,3	8	–
300	2,04	2,20	6,8	7,3	–
400	2,76	3,10	6,9	7,7	–
500	3,10	3,30	6,2	6,6	–
600	3,60	5,00	6,0	8	–
700	4,54	5,40	6,4	7,7	–
800	5,66	6,10	7,1	7,7	–
900	6,32	6,50	7,0	7,2	–
1000	6,66	7,50	6,7	7,5	–

Tabelle II
Hydrazonbildung aus BTS, ohne und mit fünfminutigem Kochen, in wässeriger Lösung

BTS direkt mg%	BTS nach Kochen mg%	Verlust %
0,96	0,88	8,3
2,08	1,93	7,2
2,98	2,70	9,4
4,14	3,92	5,3
4,95	4,85	2,0

Tabelle III
Hydrazonbildung aus BTS, ohne und mit fünfminutigem Kochen, BTS-Zusatz zu Normalblut

	BTS direkt mg%	BTS nach Kochen mg%	Verlust %
Blut allein . .	1,2		
BTS-Zusatz, abzüglich Blutwert . .	1,1	1,1	0
	2,8	2,7	3,6
	5,4	5,1	5,6
	10,4	9,6	7,7

glauben also, mit dem sehr einfachen Verfahren des 5 Minuten dauernden Siedens des trichloressigsauren Filtrates vor dem Zusatz des 2,4-Dinitrophenylhydrazins einen zuverlässigen Weg zur Ausschaltung des Azetessigsäurefehlers bei der BTS-Bestimmung gefunden zu haben. Im folgenden wird der von uns angewendete genaue Untersuchungsgang beschrieben, der im Prinzip der Methode nach Friedemann und Haugen entspricht.

Methode

1 cm³ ungeronnenes Vollblut (Liqueminzusatz stört nicht, sehr genaue Abmessung erforderlich) wird sofort nach der Blutentnahme mit 5 cm³ 10prozentiger Trichloressigsäure zwecks Enteiweißung mit Glasstab gut durchmischt. Zentrifugieren. Anschließend wird das klare Zentrifugat in einem kleinen Reagensglas in kochendes Wasser verbracht und 5 Minuten am Sieden erhalten. Nach Abkühlung werden 3 cm³ des Zentrifugates mit 1 cm³ einer 0,1prozentigen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (das Hydrazin wird mit 2 *n* HCl gelöst) im kleinen Schütteltrichter versetzt und 5 Minuten reagieren gelassen (Zeit genau einhalten!). Anschließend Zugabe von 3 cm³ reinstem Toluol. 1 Minute kräftig durchschütteln, stehenlassen bis zur Trennung von Toluolextrakt und wässeriger Lösung. Verwerfung der wässerigen Phase. Dem Toluolextrakt werden 6 cm³ 10prozentige Natriumkarbonatlösung zugesetzt, dann wird wiederum 45 Sekunden kräftig geschüttelt. Die Trennung der Phasen wird abgewartet, dann erfolgt Filtrierung der wässerigen Phase in ein Reagensröhrchen. 3 cm³ des Filtrates werden mit 3 cm³ Natriumkarbonatlösung in einem 50-cm³-Erlenmeyerkölbchen verdünnt. Dieser Lösung werden vor der photometrischen Ablesung 5 cm³ 2 *n* Natronlauge zugesetzt, wodurch Rotfärbung auftritt. Nach 5 Minuten Stehenlassen wird photometriert (am Lumetron Blau-Grün-Filter Nr. 490 benützen, am Pulfrich-Photometer Filter S 47).

Es ist notwendig, vor Beginn der BTS-Bestimmung im Blut eine Eichkurve mit reinstem Natriumpyruvat oder reinster, frisch destillierter BTS aufzunehmen. Die Lösungen bei der Bestimmung der Eichkurve werden ebenso behandelt wie das Blut.

S. Markees

Wissenschaftliches Laboratorium der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, den 21. April 1951.

Summary

In the presence of aceto acetic acid the evaluation of pyruvic acid with 2,4-dinitrophenylhydrazin is disturbed because 6–8 % of aceto acetic acid are determined as coloured hydrazon with the usual method. The elimination of aceto acetic acid can be obtained by putting the filtrate after deproteinization with trichloracetic acid into boiling water during 5 minutes. Less than 10 % of pyruvic acid are destroyed by this procedure.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

The Relative Stability of Stereoisomeric Forms of Fused Ring Systems

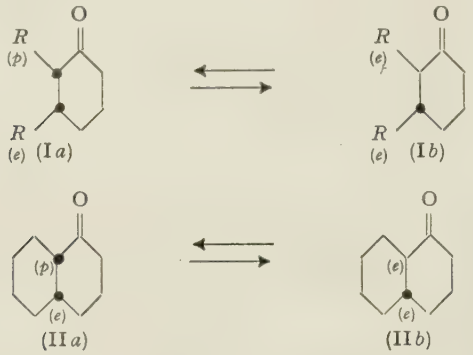
By William S. Johnson[1]

The method of conformational analysis as applied so fruitfully to the steroids by Barton[2] can be extended to rationalize the relative stability of certain fused ring systems. The premise that the cyclohexane ring is significantly more stable in the chair than the boat form, and that substituents on the ring are more stable in the equatorial (*e*) than the polar (*p*) conformation is now well accepted[1]. As has already been pointed out[1], in 1,2-disubstituted cyclohexanes it is possible for both substituents to be equatorial only when they have the trans configuration, while with the substituents cis it is necessary that one of them assume a polar conformation;

[1] Dep. of Chemistry, University of Wisconsin, Madison, Wisc., U.S.A.
[2] D. H. R. Barton, Exper. *6*, 312 (1950).

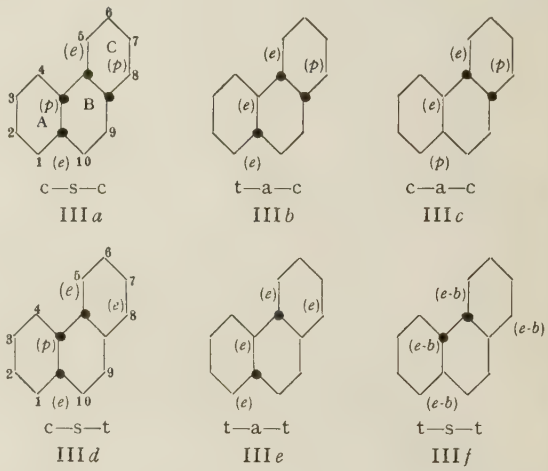
[1] For a summary of evidence see ref. 2.

hence, the trans form is generally more stable than the cis. It is obvious, then, that in cases where the two forms are interconvertible as with 2,3-disubstituted cyclohexanones I*a* and I*b*, which can be isomerized with base via the enolizable methyne hydrogen, it may be expected that the equilibrium will lie in favor of the form I*b*, *R* groups trans[1,2].



The situation is essentially the same when the two *R* groups represent a fused cyclohexane ring, and thus cis-α-decalone (II*a*) in which the cyclohexanone ring has one equatorial and one polar substituent, is isomerized to the trans isomer II*b* with two equatorial substituents[3]. Similar relative stability is found also in the corresponding hydrocarbons, where it has been shown independently that trans- is more stable than cis-decalin by conversion of the latter into the former with aluminium bromide or chloride[4].

The brilliant experiments of Linstead and his collaborators[5] in the perhydrophenanthrene series where configurations have been established unequivocally provide a basis for testing the application of the foregoing principles to polycyclic compounds. The demonstration that the cis-syn-cis form (III*a* keto group at C_9) of 9-ketoperhydrophenanthrene is isomerized to and is consequently less stable than the cis-syn-trans form (III*d*, keto group at C_9)[4] is expected, since the terminal rings *A* and *C* are fused to the central ring *B* by 2(*e*) and 2(*p*) bonds in the former as compared with 3(*e*) and 1(*p*) bonds in the latter isomer. Similarly it has been shown[5] that the trans-anti-cis ketone (III*b*, keto group at C_9) with 3(*e*) and 1(*p*) linking bonds on ring *B* is isomerized to the more stable trans-anti-trans ketone (III*e*, keto group at C_9) with 4(*e*) bonds. While the two examples cited above are strictly analogous to the case of α-decalone, it has been shown that trans-ring fusion is not always more stable than cis. Thus Linstead and Whetstone[7] found that the cis-syn-trans ketone III*d* (keto group at C_{10}) could not be isomerized to the trans-syn-trans form (III*f*, keto group at C_{10}), which is therefore concluded to be the less stable isomer. Conformational analysis with all rings assumed in the chair form gives 3(*e*) and 1(*p*) linking bonds for the former isomer and 2(*e*) and 2(*p*) bonds for the latter. From molecular models it appears, however, that the trans-syn-trans isomer (III*f*) cannot exist with the central ring *B* in the chair conformation, as it is impossible on steric grounds to have a ring fused in the trans configuration through two vicinal (*p*) bonds, since they lie perpendicularly on opposite sides of the ring. As a consequence this isomer would be expected to assume a chair-boat-chair arrangement with the end rings fused to ring *B* by four equatorial-boat bonds, i. e., 4(*e*–*b*). The greater stability of the cis-syn-trans isomer, hence becomes an experimental demonstration of the premise that the chair form is more stable than the boat comformation of cyclohexane. This evidently can be the case even when the chair form accommodates 1(*p*) substituent, i. e., a 3(*e*)–1(*p*) is more stable than a 4(*e*–*b*) arrangement.



On the basis of the foregoing, the following rules may be evolved[1]:

(1) *In saturated fused six-membered ring systems with all rings assumed to have the chair conformation those configurations with the larger number of (e) bonds at the point of ring fusion will be the more stable, the number of (e) and (p) bonds being determined as substituents of the most highly substituted rings and that alternative assignment being chosen which gives the greater number of (e) conformations.*

(2) *Since 2 meta (p) substituents (as in formula III a) show steric interference*[2]*, such a form is less stable than one with 2 para (p) substituents (like III c).*

(3) *In configurations (like III f) where both alternative assignments lead to attachment of a single ring by 2 or-*

[1] The stereochemical method of representing formulas employed here is that of Linstead [see R. P. Linstead, Chemistry and Industry *56*, 510 (1937), and R. P. Linstead, W. E. Doering, S. B. Davis, P. Levine, and R. Whetstone, J. Amer. Chem. Soc. *64*, 1985 (1942)], in which hydrogen atoms above the plane of the ring are represented by dots.

[2] This argument applies as well to 2,5-disubstituted cyclohexanones. With the 2,4- and 2,6-compounds, however, the trans forms would be expected to be less stable and hence isomerized to the cis configuration in which both groups can assume (*e*) conformations.

[3] W. Hückel and E. Brinkmann, Ann. Chem. *441*, 21 (1925); W. Hückel, R. Danneel, A. Gross, and H. Naab, Ann. Chem. *502*, 99 (1933).

[4] N. D. Zelinsky and M. B. Turowa-Pollak, Ber. Deutsch. Chem. Ges. *62*, 1658 (1929); *65*, 1299 (1932).

[5] R. P. Linstead, W. E. Doering, S. B. Davis, P. Levine, and R. Whetstone, J. Amer. Chem. Soc. *64*, 1985 (1942) *et seq.*

[6] R. P. Linstead, R. R. Whetstone, and P. Levine, J. Amer. Chem. Soc. *64*, 2014 (1942).

[7] R. P. Linstead and R. R. Whetstone, J. Chem. Soc., *1950*, 1428.

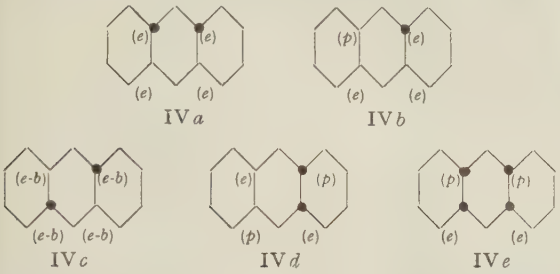
[1] These rules presumably apply to saturated systems with six or larger (medium sized) rings, but not to five and smaller rings which, because of internal steric factors tend toward coplanarity and hence favor cis- locking of the rings. Thus cis is somewhat more stable than trans hydrindane, and as the size of one ring is further reduced, the cis-configuration should become increasingly more stable with the cyclohexane ring tending toward the boat conformation. In the extreme case of a three- fused to a six-membered ring, the trans isomer would be so unstable that it might not be expected to exist.

In strainless fused ring systems where the bridgehead atoms are not connected together, conformational analysis may be applicable with appropriate modifications as, for example, in the case of 1,3-disubstituted cyclohexanes (cf. ref. 2, p. 316, left column).

[2] For a summary of evidence see ref. 2, p. 315.

tho(p) bonds, the ring involved may be forced into the boat conformation.

According to the above rules the six perhydrophenanthrenes have the following order of stability: III*e* [4(*e*)] > III*b* and III*d* [3(*e*), 1(*p*)] > III*c* [2(*e*), 2(*p*)] > III*a* [2(*e*), 2 meta(*p*)]; and III*f* [4(*e*–*b*)] < III*b* and III*d*.



Similar analysis of the perhydroanthracenes leads to the following order of stability: IV*a* [4(*e*)] > IV*b* [3(*e*), 1(*p*)] > IV*d* [2(*e*), 2(*p*)] > IV*e* [2(*e*), 2 meta(*p*)]; and IV*c* [4(*e*–*b*)] < IV*b*. Therefore that isomer, m. p. 90°, which is formed from IV*e* or IV*b* by the action of aluminium chloride[1] probably corresponds to IV*a*, and the form IV*c* which was suggested by Cook, McGinnis and Mitchell[1] as a possible, although less probable, alternative because it also contains two trans fused ring systems, can be excluded. The boat-boat-boat conformation of IV*e* (m. p. 61°) suggested by these authors might indeed be less stable than the chair-chair-chair form in spite of the 2 meta (*p*) substituents required by the latter.

Zusammenfassung

Ausgehend von neueren Anschauungen über die Stabilität verschiedener Konstellationen (conformations) monozyklischer Ringverbindungen wurden die Verhältnisse bei perhydrierten polyzyklischen Verbindungen diskutiert. Daraus konnten gewisse Regeln über die relative Stabilität der einzelnen Stereoisomeren abgeleitet werden.

[1] J. W. Cook, N. A. McGinnis, and S. Mitchell, J. Chem. Soc. *1944*, 286.

Effect of Urethane on the Incorporation of C^{14} into Animal Tissue

By G. Hevesy, R. Ruyssen, and M. L. Beeckmans[1]

From previous experiments it is known that administration of urethane enhances the incorporation of C^{14} into most tissue fractions of the mouse after injection of labeled acetate[2]. The present paper deals with the effect of urethane on the incorporation of C^{14} into phosphatides, cholesterol, and other tissue fractions of various organs of the mouse.

Experimental

In each experiment two groups of 10 to 15 adult mice of nearly equal weight (20 g) were used. Into all animals was injected intraperitoneally 0·2 ml of sodium chloride solution containing about 0·2 mg sodium acetate labeled in the carboxyl group[3].

After five minutes the urethane group was injected intraperitoneally with 0·15 ml of a 20 % aqueous urethane solution, while the control group received 0·15 ml of a physiological salt solution. The animals were killed at different times.

The same organs from each group were combined and frozen in solid CO_2. A small fraction was directly dried at 70°C and measured as total tissue.

The ground organs were extracted with a boiling mixture of ether-alcohol $^1/_3$ for 3 hours. The residue was washed repeatedly with water, then treated twice for 10 minutes at 90°C with a 5 % aqueous solution of trichloroacetic acid, the proteins being thoroughly rinsed with water after each treatment; they were then dried by washing with alcohol and ether.

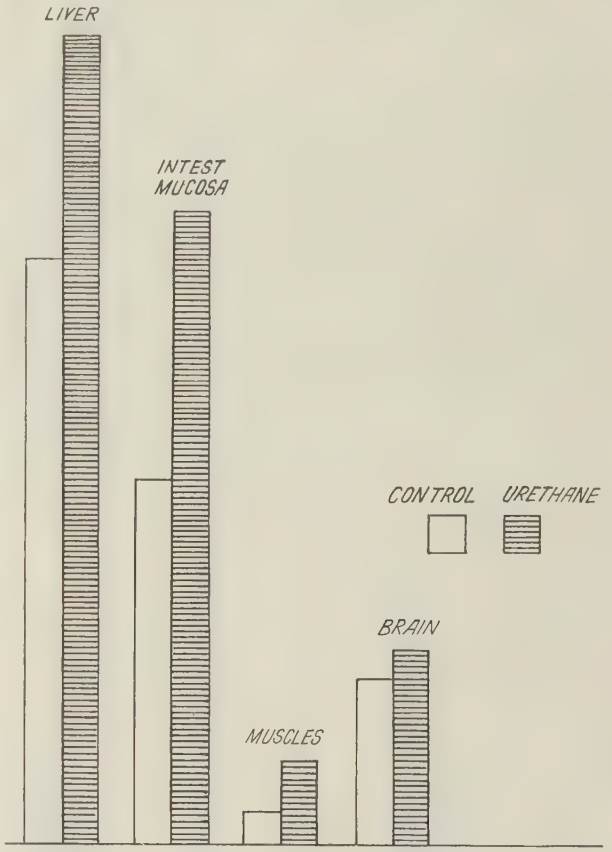


Fig. 1. – Effect of urethane on the incorporation of C^{14} into tissue phosphatides. Mice killed 100 minutes after injection of $NaCH_3C^{14}OO$.

The ether-alcohol solution was evaporated and the residue extracted with petroleum-ether. After evaporation of the petroleum-ether the total fats remained. They were purified from urea and other impurities according to the procedure proposed by Folch and Van Slyke[1]. This procedure involves the loss of some of the phosphatides.

In order to obtain the phosphatides, the total fats were dissolved in petroleum-ether and precipitated with twice the amount of cold acetone and 5 drops of an alcoholic solution of 4·5 % $MgCl_2$, precipitation being completed when the preparation had stood for 2 hours in the refrigerator. The phosphatides were centrifuged. The precipitate, dissolved in petroleum-ether, was precipitated again in the same way. After centrifugation the precipitate was dissolved in petroleum-ether and the $MgCl_2$ removed by repeatedly washing with distilled water. After evaporation of the petroleum-ether the phosphatides remained.

[1] J. Folch and D. D. van Slyke, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *41*, 514 (1939).

[1] Institute for Research in Organic Chemistry, University of Stockholm, and Pharmaceutical Institute, University of Gent.

[2] G. Hevesy, Nature *164*, 1007 (1949).

[3] We are much indebted to Dr. Loos for preparing the labeled acetate.

The supernatants from the precipitation of the phosphatides were combined and evaporated. The residue was saponified by boiling for 8 hours with 10 ml of an aqueous solution of 40 % KOH and 20 cm^3 alcohol. After saponification the solution was extracted several times with petroleum-ether. The petroleum-ether solution, concentrated to a small volume, was treated with twice its volume of a 0·5 % solution of digitonin in 80 % alcohol. The quantity of digitonin added was about 5 × the amount of cholesterol present. The precipitated cholesterol digitonin was washed once with 80 % alcohol to eliminate the excess of digitonin, with a mixture of aceton-ether (1 : 2) and finally with ether, and dried at 37°C. The radioactivity of the dry tissue, fat and protein samples was measured without converting the samples into barium carbonate.

Results and Discussion

Administration of urethane to fed mice (which obtained, however, no food after injection of labeled acetate) increases markedly the incorporation of C^{14} into the phosphatides of the liver, intestinal mucosa, muscles, and brain. The most pronounced effect is shown by the muscle phosphatides, as appears from figure 1. A much less pronounced effect is exhibited by the raw protein fractions (cf. figure 2). Hardly any difference can be observed between the C^{14} uptake of the liver proteins of the urethanized and that of the control mice. Incorporation of C^{14} into the liver cholesterol was found to be increased by 67 % and into the intestinal cholesterol by as much as 290 %. The brain proteins of the urethanized animal show a slightly lower C^{14} content than those of the controls. The mice were killed 100 minutes after injection of the labeled acetate, which took place 5 minutes before the administration of urethane.

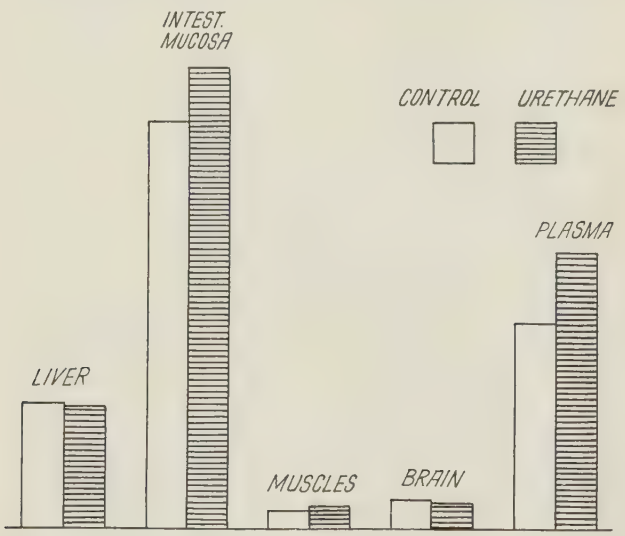


Fig. 2. – Effect of urethane in the incorporation of C^{14} into tissue proteins. Mice killed 100 minutes after injection of $NaCH_3C^{14}OO$.

In another set of experiments the effect of urethane on the incorporation of C^{14} into the total tissue, the total fats, the raw proteins was investigated. The mice were killed 110 minutes after injection of the labeled acetate. In all fractions investigated, urethane administration enhanced the incorporation of C^{14}, though the effect is markedly less pronounced in most of the protein fractions (see figures 3, 4, and 5).

In a third set of experiments, in which the animals were killed $4^1/_2$ hours after injection of acetate, administration of urethane increased the incorporation of C^{14} into all fractions (see figures 6,7,and 8). The increase was markedly less pronounced in protein than in the fatty fractions of the liver and intestinal mucosa.

When producing labeled cholesterol and numerous other labeled compounds by biosynthesis, administration of urethane may thus result in an appreciable increase in the specific activity of the product obtained.

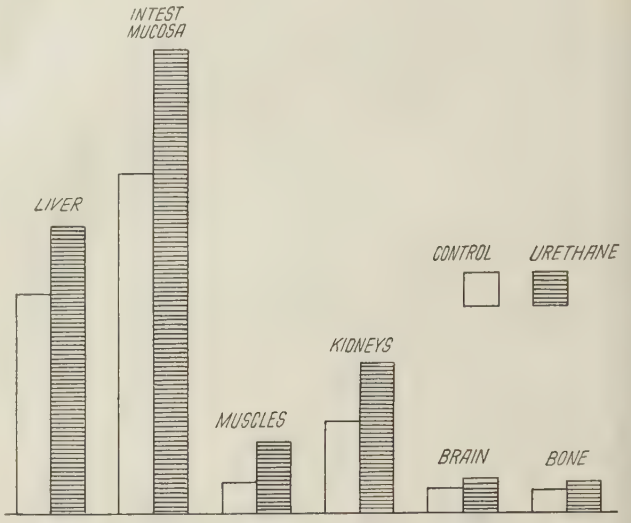


Fig. 3. – Effect of urethane on the incorporation of C^{14} into dry tissue. Mice killed 110 minutes after injection of $NaCH_3C^{14}OO$.

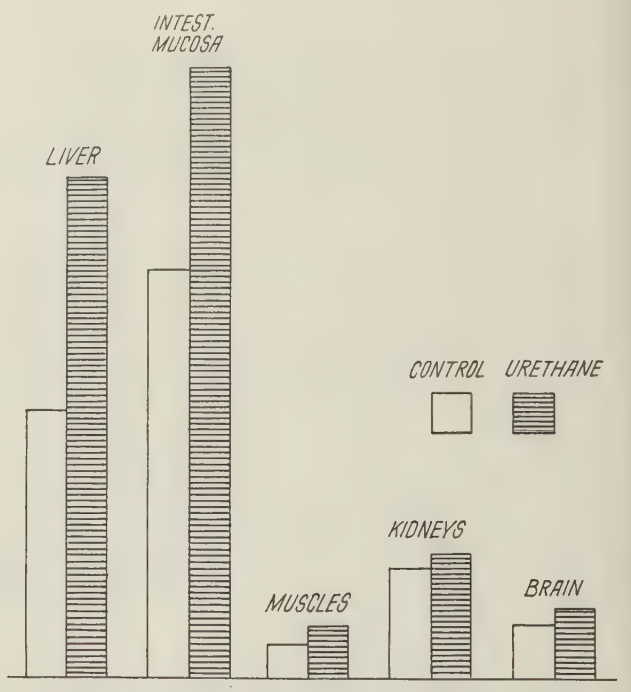


Fig. 4. – Effect of urethane on the incorporation of C^{14} into total fat. Mice killed 110 minutes after injection of $NaCH_3C^{14}OO$.

In another experiment the mice were killed 15 minutes after injection of acetate, respectively 20 minutes after injection of urethane. In this experiment, administration of urethane resulted in a decreased C^{14} uptake by the urethane-treated mice in the total fats of the organs investigated, except in the case of the intestinal mucosa. This result agrees with our expectation. In the early stage of the experiment a decreased metabolic rate leads to a decreased incorporation of C^{14}, while later, when the speci-

fic activity of the C^{14} of the tissue fat decreases (some of the labeled molecules being now renewed in a less active medium) the opposite takes place.

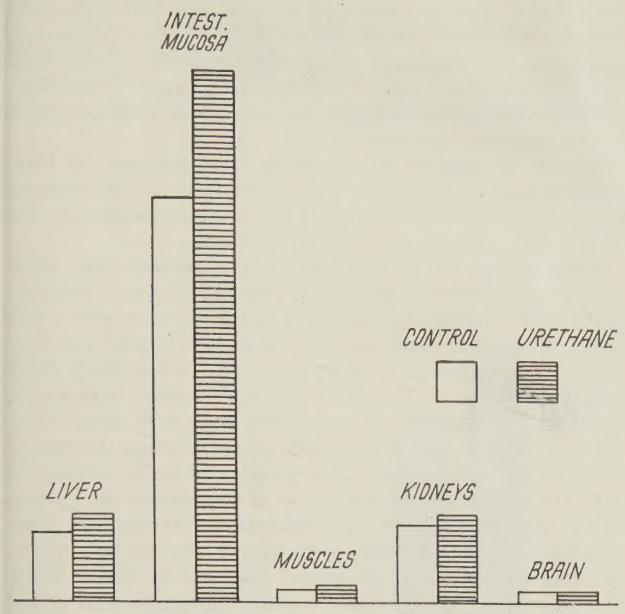


Fig. 5. – Effect of urethane on the incorporation of C^{14} into tissue proteins. Mice killed 110 minutes after injection of $NaCH_3C^{14}OO$.

A decreased rate of incorporation of C^{14} was also found in the case of the slower metabolising compound in the earliest stage of the experiment, while an increased rate was observed in a later phase when the specific activity of

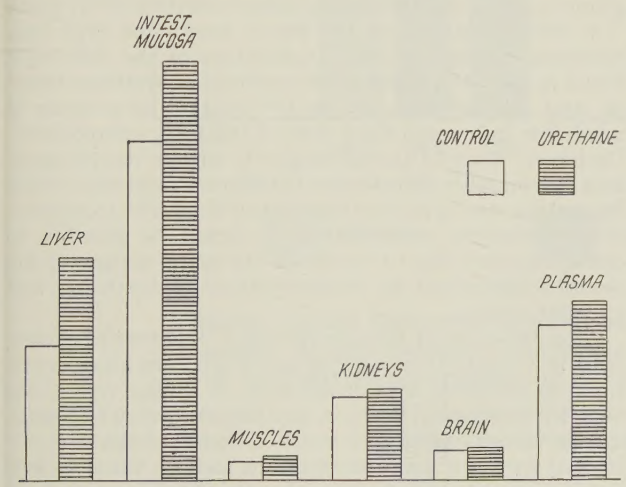


Fig. 6. – Effect of urethane on the incorporation of C^{14} into dry tissue. Mice killed 4·5 hours after injection of $NaCH_3C^{14}OO$.

the exhaled CO_2 was compared after injection of labeled acetate and succinate[1], and furthermore in the study of the effect of dinitro compounds on fat metabolism[2]. Succinate is metabolised at a slower rate than acetate; 2·3 dinitrophenol and similar compounds, when properly dosed, increase the metabolic rate.

As seen in table II, the C^{14} content of the protein fraction, is, however, not diminished in the urethane-injected mouse in the 15 minutes experiment.

[1] R. G. Gould, F. M. Sinex, I. N. Rosenberg, A. K. Solomon, and A. B. Hastings, J. Biol. Chem. *177*, 295 (1949).

[2] M. L. Beeckmans, H. Casier, and G. Hevesy, Arch. Int. Pharmacodyn. Thérap. *86*, 33 (1951).

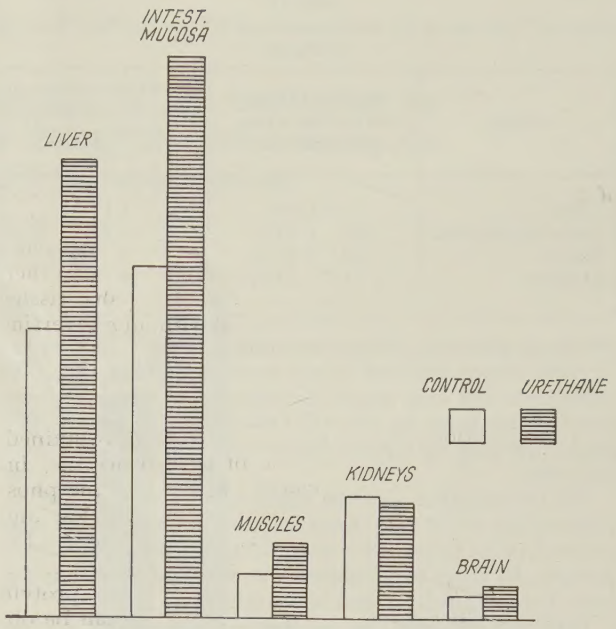


Fig. 7. – Effect of urethane on the incorporation of C^{14} into total fat. Mice killed 4·5 hours after injection of $NaCH_3C^{14}OO$.

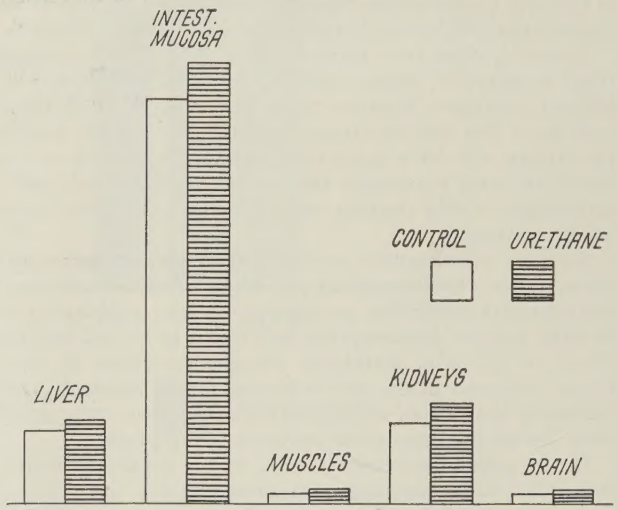


Fig. 8. – Effect of urethane on the incorporation of C^{14} into tissue proteins. Mice killed 4·5 hours after injection of $NaCH_3C^{14}OO$.

Table I

Effect of Urethane on the Incorporation of C^{14} into Total Fats of Organs. Mice killed 15 minutes after intraperitoneal injection of $NaCH_3C^{14}OO$

Organ	Relative C^{14} content of the organ fat of controls.	Percentage change in C^{14} incorporation due to urethane administration
Liver	204 (1005)	– 9·9
Intestinal mucosa	100 (493)	+13·5
Brain	9·1 (45)	– 6·8
Muscles	8·4 (42)	–17·5

50 mg of total fats of intestinal mucosa contain 0·29% of the 172,000 counts of C^{14} injected into a mouse weighing 18 g. The figures in parenthesis indicate the number of counts per minute.

Table II
Effect of Urethane on the Incorporation of C^{14} into the Raw Proteins of Organs

Organ	Relative C^{14} content of the organs of controls	Percentage change in C^{14} incorporation due to urethane administration
Liver	37·4 (195)	+11
Intestinalmucosa	100 (522)	+25
Brain	28 (12·3)	+ 7·3
Muscles	11·7 (27·9)	+ 4·3

50 mg of intestinal mucosa proteins contain 0·33 % of the 172,000 counts injected into a mouse weighing 18 g. The intestine is the only organ investigated in which the protein fraction takes up more C^{14} than does the fat fraction. Brain fats take up almost 4 times more C^{14} than do brain proteins.

We investigated also the effect of urethane on the incorporation of C^{14} into tissue fractions of mice which were starved 19–24 hours prior to the administration of labeled acetate. In these experiments the effect of urethane was both less pronounced and less uniform.

Different explanations can be put forward for the enhanced C^{14} uptake by tissue fractions under the action of urethane. Let us, for example, consider the incorporation of C^{14} into the liver fats, the C^{14} content of which is in our experiments largely due to the presence of labeled fatty acids.

About $^1/_4$ of the liver fatty acids was found[1] to be formed from acetate, $^3/_4$ being built up from other precursors. Should urethane interfere with the formation of fatty acid from the last mentioned inactive or slightly active precursors, the fatty acids in the urethane treated mouse would be built up mainly from active acetate and correspondingly would contain more C^{14} than the fatty acids of the controls.

Oxygen consumption is diminished by urethane administration. In the guinea pig 70–130 minutes after injection of 1·4 g urethane per kg body weight, a dose similar to ours, oxygen consumption was found to be reduced by 7·1 ± 1·6 %[2] only. Metabolic changes produced by urethane administration are indicated more markedly by following the rate of incorporation of C^{14} into fatty acids than by measurements of oxygen-consumption.

In the grasshoper embryo 60 % of the total respiration was found to be sensitive to urethane[3].

Another possible explanation of the enhanced incorporation of C^{14} into the urethane-treated animal is the following. As shown by Bloch and Rittenberg[4] administered labeled acetate is strongly diluted by endogenous (in experiments of short duration almost inactive) acetate. They found that in 300 g rat 35 m M acetate is produced per day. We can thus expect the daily production of endogenous acetate by a 20 g mouse to be 2 m M or somewhat more in view of the more rapid metabolism in the mouse. The injected active acetate is thus strongly diluted by inactive endogenous acetate in the body fluids, and similar considerations may apply to the degradation products of acetate.

Should the administration of urethane result in the reduction of the catabolic rate of fatty acids or of proteins and carbohydrates, the catabolism of which leads to the formation of acetate as well, the radioactive acetate would become less diluted by endogenous acetate in the urethanized mouse than in the controls, and the specific activity of the acetate would be higher in the first mentioned animal. If the rate of formation of fatty acids is not influenced, or influenced to a minor extent only, by the presence of urethane, the formation of the same amount of fatty acids in the urethanized animal will lead to a larger C^{14} content. This will be due to the higher activity level of the precursor in the urethane injected mouse.

Under physiological conditions the amount of fatty acid formed corresponds approximately to the amount simultaneously catabolized. This is not necessarily the case in the mouse injected with urethane.

Considering fat metabolism of the carcass only, Pihl and assoc.[1] arrive at the result that a 300 g rat, having a fatty acid content of 20 g, which is turned over with a half time of 18 days, produces 22 m M of acetic acid per day. Thus from this source alone about $^2/_3$ of the daily fatty acid production of 35 m M is already covered. Should the presence of urethane reduce carcass fatty acid metabolism by half of its normal value without influencing the rate of formation of fatty acids, this would lead to an increase of 0·13 percent only in the fatty acid content of the carcass in the course of the experiment taking 100 minutes. Simultaneously the specific activity of the acetate of the urethane-injected mouse would increase to about twice the value found in normal animals, which in turn would lead to a larger incorporation of C^{14} into the fatty acids of the urethane injected mouse.

In experiments of short duration, not only catabolism of fatty acids, but also of proteins and carbohydrates, leads to the formation of practically inactive acetic acid, and an interference with these processes would also cause a reduced dilution of the labeled acetate by inactive endogenous acetate and thus also a higher acetate activity level.

A dilution process of the above mentioned type can, however, not be the only explanation of the difference found in the C^{14} content of the fractions of urethane treated and control mice, as the C^{14} content of proteins is much less influenced than that of the fatty components. Urethane, which is known largely to attack dehydrogenases, presumably interferes with different metabolic steps. By making use of Rittenberg's and Bloch's[2] acetylphenylaminobutyric acid method it should be possible to decide whether the C^{14} level of the body acetate of the mouse is influenced by administration of urethane, and to what extent.

After the lapse of 100 minutes the C^{14} content of cholesterol in the intestinal mucosa was found to be about seven times as active as that of the liver. A similar result was recently obtained by Popjak and Beekmans[3], who found, in experiments taking 20 hours or more, cholesterol extracted from the small intestine to contain three to five times more C^{14} than cholesterol in the liver.

In the liver, however, a few minutes after the beginning of the experiment we find the specific activity of cholesterol to be much lower than the corresponding value of the total fatty acids. In experiments of long duration the specific activity of cholesterol was found to be markedly higher than that of the fatty acids[4]. This difference is presumably due to the presence of a rapidly renewed small fatty acid fraction in the liver[5] which is detectable only in experiments of short duration.

The authors wish to acknowledge the effective assistance of Miss de Elliott, Miss Hoeck and Mrs. Van de Putte.

[1] K. Bloch and D. Rittenberg, J. Biol. Chem. *159* 45 (1945). – L. Ponticorvo, D. Rittenberg, and K. Bloch, J. Biol. Chem. *183*, 441 (1950). – A. Pihl, K. Bloch, and H. S. Anker, J. Biol. Chem. *179*, 839 (1949).

[2] L. Lundholm, Acta Physiol. Scand. *19*, Suppl. 67 (1949).

[3] J. H. Bodine, J. Cell. Comp. Physiol. *35*, 46 (1950).

[4] K. Bloch and D. Rittenberg, J. Biol. Chem. *154*, 311 (1944).

[1] A. Pihl, K. Bloch, and H. S. Anker, J. Biol. Chem. *179*, 839 (1949).

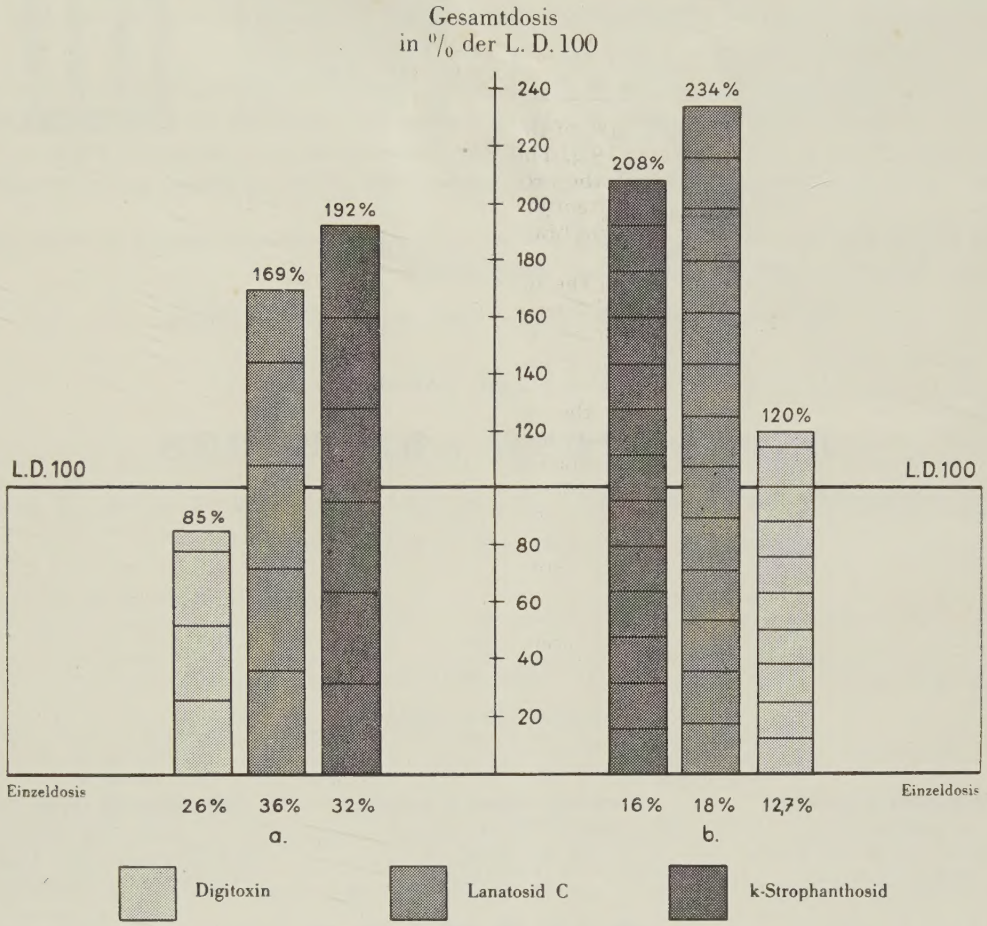
[2] K. Bloch and D. Rittenberg, J. Biol. Chem. *154*, 311 (1944).

[3] G. Popjak and M. L. Beeckmans, Biochem. J. *47*, 233 (1950).

[4] K. Bloch and D. Rittenberg, J. Biol. Chem. *159*, 45 (1945).

[5] G. Hevesy, R. Ruyssen, and M. L. Beeckmans, Exp. 7, 144 (1951).

Mit den pharmakologischen Untersuchungen in den Laboratorien der Sandoz A.G. wurde ein wesentlicher Beitrag zur Differenzierung der verschiedenen herzwirksamen Glycoside geleistet.



Relative toxische Kumulation herzwirksamer Glycoside bei chronischer Verabreichung am Ganztier. Es wird diejenige Gesamtmenge eines herzwirksamen Glycosides, welche zum Tod des Tieres führt, verglichen mit der einmaligen letalen Infusionsdosis nach *Hatcher*

a) bei Verabreichung von grösseren Einzeldosen,
b) bei Verabreichung von kleineren Einzeldosen.

Die Versuche demonstrieren die geringe relative toxische Kumulation von Lanatosid C und k-Strophanthosid.

Suter E., Rothlin E. und Bircher R.: „Glykosidwirkung auf Elektrokardiogramm und Myokard". Helv. Physiol. Acta 7, 1, 1949

SANDOZ A.G. - BASEL

SANDOZ

BIOLOGICAL ABSTRACTS

A cooperative undertaking by biologists themselves to provide a means for keeping abreast of the rapidly growing and increasingly diversified literature in all fields of biology.

No individual possibly could read the thousands of journals containing significant contributions to the biological sciences. It is well known that much needless effort has been expended on problems that already had been solved. That is why a comprehensive abstracting and indexing service is so necessary both in research and in teaching.

Biological Abstracts covers all the important journals in the United States and many throughout the entire world. Publishing close to 40000 abstracts annually, it affords the only means by which biologists can keep posted on the work of others in all fields of biology. The annual subscription price of $40.00 (U.S. funds) is low because more than 3000 biologists contribute their services for little or no remuneration.

Biological Abstracts also is published in nine low-priced sectional editions specially designed for individuals who are interested only in one or more closely related fields.

The Back Volumes from Volume I (1927) to date still are available.

Write for complete information

BIOLOGICAL ABSTRACTS

UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA PHILADELPHIA 4, PA., U.S.A.

Im August 1951 erscheint:

Journal International d'Acoustique
sous le patronage du
Groupement des Acousticiens
de Langue Française

International Journal of Acoustics
sponsored by the Acoustics Group
of the Physical Society
of London

Internationale Akustische Zeitschrift
unter Mitwirkung
des Verbandes der Deutschen
Physikalischen Gesellschaften

ACUSTICA

edited by Dr. C. W. KOSTEN, Editor in chief, Delft, Holland –
Dr. E. G. RICHARDSON, Newcastle on Tyne – Prof. Dr. A. GIACOMINI, Roma
publié par Dr. F. CANAC, Marseille

herausgegeben von Prof. Dr. E. MEYER, Göttingen

Die Beiträge erscheinen in deutscher, französischer und englischer Sprache

6 Hefte pro Jahr von je 48 Seiten Umfang, im Format von 21 × 29,7 cm
Abonnementspreis Fr. 36.– jährlich - Einzelheft Fr. 6.50, zuzüglich Porto

Die Zeitschrift wird alle wesentlichen Forschungsarbeiten aus dem Gebiet der Akustik bringen, seien sie rein wissenschaftlicher, angewandter, physikalischer, musikalischer oder physiologischer Natur. – Besondere Interessenten sind: Technische Physiker, Architekten und Bauingenieure, Fachleute für Lärmbekämpfung, Elektro- und Nachrichtentechniker, PTT, Rundfunk, die elektrotechnische Industrie (Radio, Telephon, Grammophon, Lautsprecher, Tonaufnahme-, Tonfilm-, elektronische Apparate), Hörapparatebau, Musikinstrumentenbau. – Ein vierseitiger dreisprachiger Prospekt steht zur Verfügung.

S. HIRZEL VERLAG, ZÜRICH